

Untersuchungen zur Expression und Inhibition von Orthopockenvirus-Genen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Janine Reiche, geb. Hergesell

29.07.1978, Markranstädt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Detlev H. Krüger
2. Prof. Dr. Georg Pauli
3. Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2010

Zusammenfassung

Nicht nur die mögliche Verwendung von Variolavirus als bioterroristischer Kampfstoff sondern auch das zoonotische Potential pathogener Pockenviren wird als eine erhebliche Gefahr für das öffentliche Gesundheitswesen diskutiert. Zurzeit liegt in der Bevölkerung kein ausreichender Impfschutz vor. Mit Ausnahme der Expositionsprophylaxe steht die Vakzination als einzige Prävention zur Verfügung, von der bekannt ist, dass sie mit erheblichen Impfkomplicationen assoziiert ist. Therapeutische Ansätze sind deshalb von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurden HEp-2-Zellen mit den Orthopockenviren (OPV) VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus sowie die Zelllinien 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 mit Calpoxvirus infiziert und der Replikationszyklus analysiert. Die Genexpression von Faktoren der Transkription (*D7R*), der DNA-Replikation (*K4L*) oder für Strukturproteine (*D8L*, *A56R*, *A27L*) wurde unabhängig vom untersuchten Virus und der Zelllinie gleich reguliert, was auf eine wichtige Rolle während der Virusreplikation hinweist. Ferner wurde ein siRNA-System zur Hemmung der OPV-Gene *D7R*, *K4L*, *D8L*, *A56R* und *A27L* etabliert. Die Transkription von *D7R*, *K4L*, *D8L* und *A27L* wurde in infizierten Zellen effektiv durch spezifisch eingesetzte shRNAs inhibiert und dadurch die Virusreplikation von Calpoxvirus im Vergleich zu den Kontrollzellen 24 und 48 Stunden nach der Infektion gehemmt. Die Inhibition der *A27L*-Genexpression wurde zusätzlich im Western Blot für Calpoxvirus- und VACV-LE-infizierte 293-Zellen nachgewiesen. *A56R* wurde weder für die Replikation von Calpoxvirus noch von VACV-LE in der Zellkultur benötigt.

Da die Gene *D7R*, *K4L*, *D8L* und *A27L* essentiell für die Replikation von OPV in der Zellkultur waren, könnten sie potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung von antiviralen Substanzen für die Behandlung einer OPV-Infektion darstellen.

Schlagwörter: Orthopockenviren, Calpoxvirus, Replikation, Genexpression, siRNA

Abstract

Not only the potential use of smallpox in a bioterrorist attack but also the zoonotic potential of other poxviruses infecting animals are discussed to be a public health threat. At present, there is no sufficient protection in the human population provided by vaccination. Prophylactic vaccination was effective but has been associated with serious adverse effects. No proven drug treatment is available. Therefore, therapies and new treatment strategies are greatly needed.

In this study HEp-2 cells were infected with the orthopoxviruses (OPV) VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 and Calpoxvirus. In addition, the cell lines 293, A-549, Huh-7 and HSB-2 were infected with Calpoxvirus alone to determine the OPV replication cycle. Irrespective of the analyzed virus and cell line gene expression was regulated similarly for factors involved in transcription (*D7R*), DNA replication (*K4L*) or for structural proteins (*D8R*, *A56R*, *A27L*), indicating an important role in virus replication. Furthermore, a siRNA-system for the inhibition of the OPV genes *D7R*, *K4L*, *D8L*, *A56R* and *A27L* was established. It could be shown, that specific shRNAs effectively inhibited transcription of *D7R*, *K4L*, *D8L* and *A27L* in infected cells and repressed Calpoxvirus replication 24 and 48 hours post infection in comparison to control cells. In addition, the inhibition of *A27L* gene expression was shown in Western Blot analyses for Calpoxvirus- and VACV-LE-infected 293 cells. *A56R* is not required for virus replication of Calpoxvirus and VACV-LE in cell culture.

Since *D7R*, *K4L*, *D8L* and *A27L* seem to be essential for OPV replication in cell culture, these OPV genes might serve as potential targets for the development of antiviral substances for the treatment of OPV infections.

Keywords: orthopoxvirus, Calpoxvirus, replication, gene expression, siRNA

Abkürzungsverzeichnis

Viren

CMLV-CP-19	Kamelpockenvirus CP-19
CMLV-M-96	Kamelpockenvirus M-96
CPXV-81-02	Kuhpockenvirus 81/02
CPXV-BR	Kuhpockenvirus Brighton Red
CPXV-GRI	Kuhpockenvirus GRI-90
ECTV-MOS	Mauspockenvirus Moscow
MPXV-USA-2003	Affenpockenvirus USA-2003
MPXV-ZAI-1979	Affenpockenvirus Zaire-1979
OPV	Orthopockenviren
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
VACV-1354	Vacciniavirus 1354
VACV-ANK	Vacciniavirus Ankara
VACV-COP	Vacciniavirus Copenhagen
VACV-LE	Vacciniavirus Lister-Elstree, produziert von Berna Biotech AG
VACV-LIS	Vacciniavirus Lister
VACV-MVA	Vacciniavirus Modified Vaccinia Ankara
VACV-MVA-Acam-3000	Vacciniavirus Modified Vaccinia Ankara Acambis 3000
VACV-MVA-BN	Vacciniavirus Modified Vaccinia Ankara, produziert von Bavarian Nordic GmbH
VACV-WR	Vacciniavirus Western Reserve
VARV-BSH	Variolavirus major Bangladesh-1975
VARV-GAR	Variolavirus minor Garcia-1966

sonstige Abkürzungen

AT	Österreich
CEV	cell-associated enveloped virus, zellassoziertes behülltes Virus
CH	Schweiz
CPE	cytopathic effect, zytopathischer Effekt
Crm	cytokine responsive modifying protein, Cytokinrezeptor
DE	Deutschland
DK	Dänemark
dsDNA	Doppelstrang-DNA

dsRNA	Doppelstang-RNA
EEV	extracellular enveloped virus, extrazelluläres behülltes Virus
GAG	Glukosaminoglykan
GB	United Kingdom, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
GFP	green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
IEV	intracellular enveloped virus, intrazelluläres behülltes Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMV	intracellular mature virus, intrazelluläres reifes Virus
ITR	inverted terminal repeats, invertierte terminale Wiederholungen
IV	immature virus, unreifes Virus
MOI	multiplicity of infection, Verhältnis von infektiösem Virus zur Zielzelle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OAS	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
p. i.	post infectionem, nach der Infektion
PFU	plaque forming unit, Plaquebildende Einheit
PKR	Proteinkinase R
rek.	rekombinant
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
SE	Schweden
Sek.	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
ssRNA	Einzelstrang-RNA
T _A	Annealing-Temperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
US	United States, Vereinigte Staaten
VETF	VACV early transcription factor, früher Transkriptionsfaktor des VACV
VLTF	VACV late transcription factor, später Transkriptionsfaktor des VACV
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologie von OPV.....	13
Abb. 2: Replikationszyklus von OPV am Beispiel von VACV	15
Abb. 3: Mögliche IMV- und EEV-Eintrittsmechanismen	17
Abb. 4: Self-Priming Modell für die DNA-Replikation von VACV	20
Abb. 5: Prinzip der RNAi.....	26
Abb. 6: Detektion von viraler mRNA in OPV-Partikeln	61
Abb. 7: Replikation von OPV in humanen Zelllinien	63
Abb. 8: Expression von regulatorischen OPV-Genen	67
Abb. 9: Expression von Strukturgenen.....	68
Abb. 10: Expression von immunmodulatorischen OPV-Genen	70
Abb. 11: Expression der rekombinanten Proteine D7, A27, A56 und D8 in 293-Zellen.....	74
Abb. 12: IFT von OPV-Antigenen durch anti-D7-IgY-Antikörper sowie Maus-anti-A27-Antikörper	75
Abb. 13: Ermittlung der D7-Nachweisgrenze im Western Blot	77
Abb. 14: Expressionskinetik von A27	78
Abb. 15: <i>In vitro</i> Synthese von ShortCut siRNA	79
Abb. 16: mRNA-Expression und Virustiter von VACV-LE	81
Abb. 17: Aufbau einer shRNA-Expressionskassette am Beispiel der Kontroll-shRNA AB01.....	82
Abb. 18: <i>D7R</i> -mRNA-Expression und Virustiter von Calpoxvirus	84
Abb. 19: <i>A56R</i> -mRNA-Expression und Virustiter von Calpoxvirus	85
Abb. 20: mRNA-Expression und Virustiter von Calpoxvirus	87
Abb. 21: Reduktion der <i>A27L</i> -Genexpression führt zur Inhibition der Calpoxvirusreplikation.....	91
Abb. 22: Reduktion der <i>A27L</i> -Genexpression führt zur Inhibition der Replikation von VACV-LE	92

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wirtsspezifität und geographische Verteilung von humanpathogenen Spezies der <i>Chordopoxvirinae</i> .	12
Tab. 2: Bekannte Proteine auf der Oberfläche von IMV-, IEV, CEV- und EEV-Partikeln	23
Tab. 3: Verwendete Zellen	30
Tab. 4: Verwendete OPV	31
Tab. 5: Primersequenzen für die Synthese von ShortCut siRNA	37
Tab. 6: Oligonukleotidsequenzen für die Herstellung von shRNA-Expressionsvektoren	38
Tab. 7: PCR-Ansatz (50 µl)	41
Tab. 8: Real-time PCR-Ansatz (25 µl)	42
Tab. 9: Primer und Sonden für die real-time PCR	42
Tab. 10: Sequenzierungsansatz (10 µl)	47
Tab. 11: Primersequenzen für die Sequenzierungsreaktion	47
Tab. 12: Primersequenzen für die Amplifikation von OPV-Genen	48
Tab. 13: Restriktionsansatz	48
Tab. 14: Dephosphorylierung des verdauten Vektors	49
Tab. 15: Ligationsansatz	49
Tab. 16: Zusammensetzung der PAA-Gele	53
Tab. 17: Antikörper für den immunologischen Nachweis im Western Blot	55
Tab. 18: Antikörper für den IFT	57
Tab. 19: Immunmodulatorische Gene in OPV-Genomen	66

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	2
ABSTRACT	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
TABELLENVERZEICHNIS	7
INHALTSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Pockenviren	11
1.1.1 Taxonomie und charakteristische Vertreter.....	11
1.1.2 OPV-Ausbruch in Neuweltaffen – Identifizierung eines neuen OPV-Isolats.....	12
1.1.3 Morphologie von OPV	13
1.1.4 Genom der OPV	14
1.1.5 Replikation und Morphogenese	16
1.1.6 Immunmodulation.....	21
1.2 Vakzination und Therapieansätze zum Schutz vor Pockenviren	23
1.3 RNA-Interferenz	25
1.4 Ziele der Arbeit	27
2 MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Technische Geräte.....	28
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.3 Kultivierung von Zellen.....	29
2.4 Präparation von embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF-Zellen)	30
2.5 Virusanzucht	31
2.6 Bestimmung des infektiösen Virustiters.....	32
2.6.1 Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (PFU).....	32
2.6.2 Bestimmung der Kulturinfektiösen-Dosis 50	32
2.7 Infektion von humanen Zelllinien mit OPV	33
2.8 Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	34
2.8.1 Transfektion mit RNAiFect Transfection Reagent.....	34
2.8.2 Transfektion mit Lipofectamin™ 2000	34
2.9 Infektion von transfizierten Zellen.....	35
2.10 Proteinisolation aus eukaryontischen Zellen.....	36
2.11 Herstellung von siRNA.....	36
2.11.1 ShortCut siRNA.....	36
2.11.2 shRNA	37
2.12 Isolierung von Nukleinsäuren	39
2.12.1 RNA-Extraktion.....	39
2.12.2 DNA-Extraktion	39
2.12.3 DNase-, RNase-Verdau.....	39

2.13	cDNA-Synthese	40
2.14	Konventionelle PCR	40
2.15	Quantitative real-time PCR.....	41
2.16	Gelelektrophorese zur Identifikation von PCR-Produkten	41
2.17	Aufreinigung von DNA	44
2.17.1	Aufreinigung von DNA aus PCR-Reaktionsansätzen.....	44
2.17.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	44
2.18	Klonierung	44
2.18.1	Präparation kompetenter Zellen.....	44
2.18.2	TOPO TA Klonierung.....	44
2.18.3	Präparation von rekombinanten Bakterienkulturen	45
2.18.4	Berechnung der Kopienzahl.....	45
2.19	Plasmid-Präparation.....	45
2.20	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen	46
2.21	Sequenzierung von DNA	46
2.22	Herstellung rekombinanter Expressionsplasmide	47
2.23	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3).....	50
2.23.1	Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	50
2.23.2	Rekombinante Proteinexpression	50
2.23.3	Präparation und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	51
2.24	Immunisierung von Hühnern	52
2.25	Western Blot.....	52
2.25.1	Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese	53
2.25.2	Blotten	54
2.25.3	Immunodetektion.....	54
2.26	Immunfluoreszenztest (IFT)	55
2.26.1	Herstellung der Präparate.....	55
2.26.2	IFT	56
3	ERGEBNISSE.....	58
3.1	Charakterisierung der Replikation von OPV <i>in vitro</i>	58
3.1.1	Etablierung von real-time PCR-Systemen für <i>K4L</i> , <i>D8L</i> , <i>A27L</i> , <i>C12L</i> und <i>E3L</i>	59
3.1.2	Bringen Pockenviren ihre RNA mit?	60
3.1.3	Ermittlung der Infizierbarkeit humaner Zelllinien.....	61
3.1.4	Infektion von humanen Zelllinien mit OPV	61
3.1.5	Beschreibung des Replikationszyklus von OPV.....	62
3.1.6	Expression von OPV-Genen	64
3.2	Expression von rekombinanten OPV-Proteinen zur Antikörper-Gewinnung.....	72
3.2.1	Herstellung von rekombinanten Plasmiden für <i>D7R</i> , <i>A27L</i> , <i>A56R</i> und <i>D8L</i>	72
3.2.2	Expression der rekombinanten OPV-Proteine <i>D7</i> , <i>A27</i> , <i>A56</i> und <i>D8</i> in unterschiedlichen Expressionssystemen	72

3.3	Charakterisierung der D7- und A27-Antikörper	75
3.3.1	Reaktivität und Spezifität der Antikörper im IFT	75
3.3.2	Reaktivität der Antikörper im Western Blot.....	76
3.4	Etablierung eines siRNA-Systems zur Inhibition der OPV-Replikation.....	78
3.4.1	RNAi durch ShortCut siRNA	78
3.4.2	RNAi durch short hairpin RNA (shRNA).....	81
3.5	Inhibition der Replikation von OPV durch RNAi.....	88
3.5.1	Inhibition der Virusreplikation von Calpoxvirus	88
3.5.2	Inhibition der Virusreplikation von VACV-LE	89
4	DISKUSSION	93
4.1	Regulation der OPV-Replikation	93
4.2	Etablierung von siRNA-Transfektionssystemen	96
4.3	Identifizierung von potentiellen Zielgenen für eine siRNA-Therapie.....	98
4.4	RNAi als Therapieansatz gegen OPV-Infektionen.....	104
	LITERATURVERZEICHNIS.....	107
	AUTORENERKLÄRUNG.....	116
	DANKSAGUNG.....	117
	LEBENS LAUF	118
	PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN	119

1 Einleitung

1.1 Pockenviren

1.1.1 Taxonomie und charakteristische Vertreter

Die Familie der *Poxviridae* umfasst eine große Anzahl verschiedener Virusspezies, die sich im Zytoplasma von Vertebraten- oder Invertebratenzellen vermehren. Pockenviren sind die größten bekannten Viren. Im Viruscore sind sowohl Enzyme wie die DNA-abhängige RNA-Polymerase als auch das lineare, doppelsträngige DNA-Genom enthalten [1]. Entsprechend ihrem Wirtsspektrum werden sie in zwei Unterfamilien eingeteilt: die *Chordopoxvirinae*, welche Wirbeltiere befallen, sowie in die *Entomopoxvirinae*, die Pockenviren der Insekten [2]. Die Einordnung in Genera innerhalb der Unterfamilien erfolgt auf der Grundlage genetischer und morphologischer Übereinstimmungen sowie anhand des Wirtsspektrums [2].

Die Unterfamilie der *Chordopoxvirinae* ist in acht Genera gegliedert: *Ortho-*, *Para-*, *Mollusci-*, *Yata-*, *Avi-*, *Capri-*, *Lepori-* und *Suipockenviren*. Spezies der ersten vier Genera können Infektionen beim Menschen verursachen (Tab. 1), wobei der Großteil der Infektionen Zoonosen darstellen. Nur das *Variolavirus* (VARV) und das *Molluscum-contagiosum-Virus* sind obligat humanpathogene Erreger [2].

In das Genus der *Orthopockenviren* (OPV) wird der wohl bekannteste Vertreter der Pockenviren, das VARV, eingeordnet. Eine Infektion mit diesem Erreger führte zu der Erkrankung der Menschenpocken oder auch kurz Pocken genannt [1]. Da der Mensch der einzige Wirt für dieses Virus ist, konnte es durch eine weltweite Impfkampagne der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ausgerottet werden. Weitere Vertreter der OPV sind das als Impfvirus verwendete *Vacciniavirus* (VACV) und verschiedene tierpathogene Erreger mit zum Teil zoonotischen Potential [3]. Dazu gehören unter anderem die *Kuhpockenviren* (CPXV), die eigentlich in Nagetieren verbreitet sind und relativ häufig auf Katzen übertragen werden [4]. Über Hautläsionen kann sich der Mensch infizieren. Aber auch die *Affenpockenviren* (MPXV), deren Reservoir afrikanische Nagetiere sind, können auf Schimpansen und Totenkopffaffen, aber auch auf den Menschen übertragen werden und als Zoonose beim Menschen eine schwere pockenartige Erkrankung hervorrufen [3]. Einzelfälle aber auch Ausbrüche mit Erkrankungen mehrerer Menschen treten sporadisch in Afrika auf [1]. Der Import von afrikanischen Gambia-Riesenhamsterratten (*Cricetomys sp.*) in die USA führte dort 2003 zu einem MPXV-Ausbruch [5].

Tab. 1: Wirtsspezifität und geographische Verteilung von humanpathogenen Spezies der *Chordopoxvirinae* [3,6]

Genus und Spezies	Abkürzung ¹	Wirtsspektrum	Reservoir-Wirt	andere Wirte	geographische Verbreitung
<i>Orthopockenvirus</i>					
<i>Variolavirus</i>	VARV	eng	Mensch	kein	ausgerottet (früher weltweit)
<i>Vacciniavirus</i>	VACV	breit	unbekannt	Mensch, Rind, Katze, Nager, Schweine	unbekannt
<i>Kuhpockenvirus</i>	CPXV	breit	Nager	Mensch, Rind, Katze, Zootiere	Europa, Vorderasien
<i>Affenpockenvirus</i>	MPXV	breit	Nager	Mensch, Primaten, Zootiere	West- und Zentralafrika
<i>Kamelpockenvirus</i>	CMLV	eng	Kamel	kein	Asien, Afrika
<i>Mauspockenvirus</i>	ECTV	eng	Nager	kein	Europa
<i>Parapockenvirus</i>					
<i>Bovines papuläres Stomatitisvirus</i>	BPSV	breit	Rind	Mensch	weltweit
<i>Orfvirus</i>	ORFV	breit	Schaf	Wiederkäuer, Mensch	weltweit
<i>Pseudokuhpockenvirus</i>	PCPV	breit?	Rind	Mensch	weltweit
<i>Robbenparapockenvirus</i>	n.v.	breit?	Robbe	Mensch	weltweit
<i>Molluscipockenvirus</i>					
<i>Molluscum-contagiosum-Virus</i>	MOCV	eng	Mensch	kein	weltweit
<i>Yatapockenvirus</i>					
<i>Tanapockenvirus</i>	TANV	breit	Nager?	Mensch, Primaten	Ost- und Zentralafrika
<i>Yabapockenvirus</i>	YLDV	breit	unbekannt	Mensch, Primaten	Westafrika

¹ Die Abkürzung der Spezies erfolgt auf der Grundlage des International Committee on Taxonomy of Viruses 2002 (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm). n.v. = nicht vergeben

1.1.2 OPV-Ausbruch in Neuweltaffen – Identifizierung eines neuen OPV-Isolats

In einem niedersächsischen Privatzoo in Deutschland kam es 2002 zu einem Pockenvirusausbruch in einer Kolonie von 50 Neuweltaffen, von denen sechs Tiere an einer typischen OPV-Symptomatik verstarben [7]. Sowohl in der Elektronenmikroskopie als auch in der PCR wurde der Erreger als OPV identifiziert.

Dieses OPV konnte in verschiedenen Organen aller erkrankten Tiere nachgewiesen und aus der Haut eines infizierten Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) isoliert werden. In Bezug auf seinen Wirt *Callithrix jacchus* wurde es mit Calpoxvirus bezeichnet. Phylogenetisch zeigt das Calpoxvirus die größte Homologie zu den CPXV [8]. Inzwischen wurde mit dem Calpoxvirus ein nicht-humanes Primatenmodell in Marmosets zur Evaluierung neuer Vakzinierungsstrategien bzw. antiviraler Therapien etabliert. In diesem Modell werden mit einer niedrigen Infektionsdosis von $8,3 \times 10^2$ PFU VARV-ähnliche Symptome hervorgerufen, was auf eine hohe Pathogenität des Calpoxvirus hinweist.

1.1.3 Morphologie von OPV

Die OPV gehören mit einer Größe von ca. 360 x 270 x 250 nm zu den größten Viren [2]. Sie haben in der Elektronenmikroskopie (Negativkontrastierung) eine ovale bis ziegelsteinähnliche Gestalt und eine strukturierte Oberfläche (Abb. 1B). In Ultradünnschnitten kann man ein hantelförmiges Core erkennen, in dem sich das virale Genom befindet (Abb. 1C). An den Einbuchtungen des Cores befinden sich zwei als Lateralkörper bezeichnete Strukturen, deren Zusammensetzung bisher nicht aufgeklärt wurde und die möglicherweise Präparationsartefakte der Elektronenmikroskopie darstellen [9]. Generell unterscheidet man bei den OPV zwei infektiöse Formen, die IMV- (engl., intracellular mature virus) und die EEV- (engl., extracellular enveloped virus) Partikel, welche jeweils von ein oder zwei Hüllmembranen umgeben sind [2]. Abb. 1A gibt schematisch den Aufbau von OPV wieder.

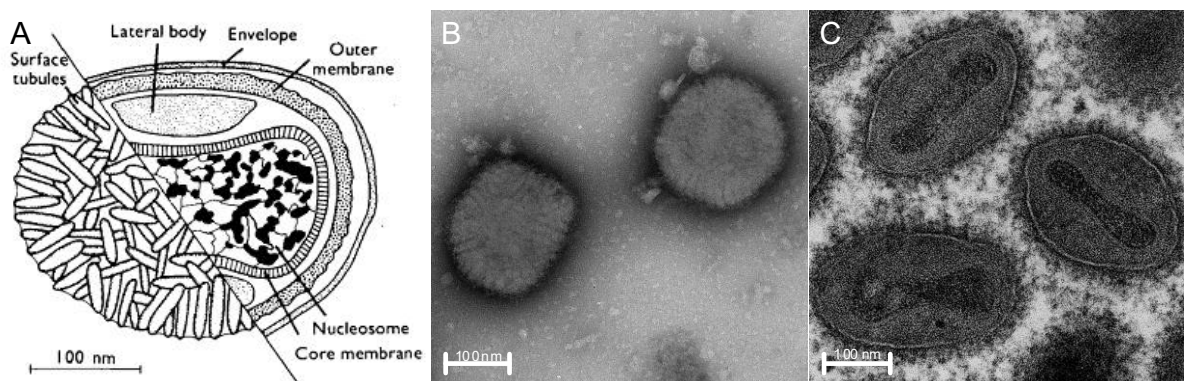


Abb. 1: Morphologie von OPV. (A) Schematische Darstellung eines OPV-Partikels anhand des VACV. Linke Hälfte: Oberflächenstruktur eines IMV-Partikels, rechte Hälfte: Schnitt durch einen EEV-Partikel. Quelle: Fenner et al, 1988 [1]; Elektronenmikroskopische Darstellung des VACV durch Negativkontrastierung (B) und eines Ultradünnschnitts des VARV (C). Aufnahmen: H. R. Gelderblom (Robert Koch-Institut, Berlin, DE)

1.1.4 Genom der OPV

1.1.4.1 Aufbau

OPV besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von 165 kbp bis 210 kbp [1]. An den Genomenden befinden sich sogenannte „inverted terminal repeats“ (ITR). Dies sind invers angeordnete Tandem-Wiederholungen von kurzen DNA-Abschnitten. Beide DNA-Stränge sind an den Genomenden durch Hairpin-Loops kovalent miteinander verbunden [10,11].

Das Genom kodiert für ca. 150 bis 200 Proteine. Die für die Replikation, einschließlich der Synthese von Strukturproteinen und Nukleinsäuren, wichtigen Gene befinden sich in der konservierten Mitte des Genoms. Gene hingegen, die zur Wirtsspezifität oder der Virulenz beitragen sind in den variablen, terminalen Regionen des Virus-Genoms lokalisiert [12].

1.1.4.2 Nomenklatur der kodierenden Sequenzen

Das erste komplett sequenzierte Pockengenom war das von VACV Copenhagen (VACV-CP) [13]. Mit der Veröffentlichung dieser Sequenz wurde auch erstmalig eine Nomenklatur festgelegt, welche sich an den entstandenen Fragmenten nach einem HindIII-Verdau der Pockenvirus-DNA orientiert. In absteigender Reihenfolge wurden die Gene von den großen zu den kleinen Fragmenten mit A bis P bezeichnet, die ORFs von links nach rechts durchnummeriert und die Orientierung des Leserahmens mit L für Links bzw. R für Rechts angegeben [13]. Beispielsweise wird die RNA-Polymerase-Untereinheit – auch als *rpo18* bezeichnet - von dem Gen *D7R* kodiert. *D7R* ist das siebte Gen vom linken Ende des HindIII-D-Fragmentes und wird in Bezug auf die standardmäßige 5'-3'-Orientierung des Genoms nach rechts abgelesen. Eine Ausnahme für diese Vorgehensweise bildet das HindIII-C-Fragment. Hier wurden die ORFs von rechts nach links nummeriert, damit nicht an dem hochvariablen Genomende begonnen werden musste [13].

Mit der fortlaufenden Veröffentlichung von neuen Sequenzdaten für Pockenvirusgenome, ist es nahezu unmöglich geworden, orthologe Gene von VACV-CP auf andere Stämme zu übertragen. Deshalb ist man dazu übergegangen, die Gensequenzen vom linken zum rechten Genomende nacheinander durchzunummerieren [14]. In dieser Arbeit wurde die alte immer noch gebräuchliche Nomenklatur in Bezug auf VACV-CP verwendet. War es nicht möglich diese Nomenklatur durchgängig zu verwenden, da das entsprechende Gen in dem verwendeten Stamm deletiert oder nicht vorhanden ist, wurde entsprechend darauf verwiesen.

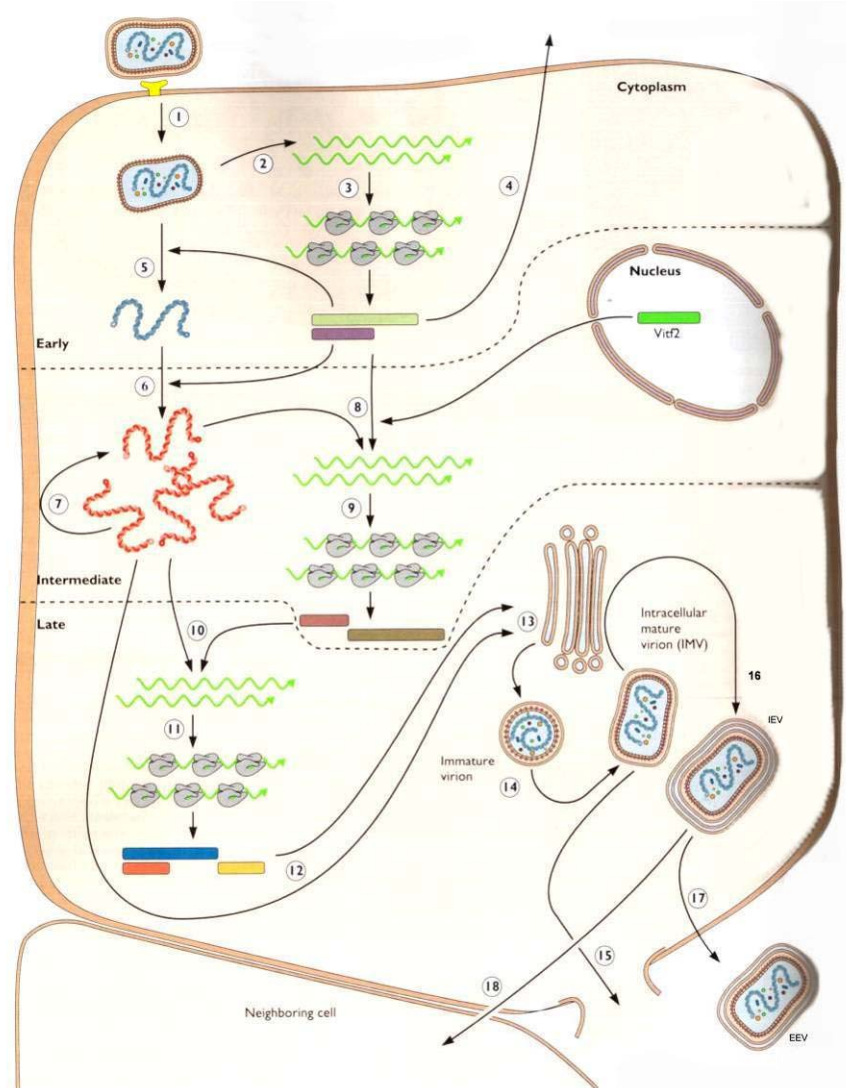


Abb. 2: Replikationszyklus von OPV am Beispiel von VACV. (1) Der Replikationszyklus wird durch die Fusion des Virus mit der Zellmembran und der Entlassung des Virus-Cores in das Zytoplasma eingeleitet. (2) Transkription der frühen mRNA. (3) Die Translation der mRNA erfolgt durch den zellulären Translationsapparat. (4) Einige frühe Gene kodieren entweder für Homologe der zellulären Wachstumsfaktoren oder Zytokinrezeptoren und können dadurch die Proliferation von Nachbarzellen auslösen oder die Immunabwehrmechanismen des Wirtes manipulieren. (5) Die frühen Proteine induzieren den Abbau des Virus-Cores. Die frühe Transkription wird gestoppt und die virale DNA freigesetzt. (6) Die DNA-Replikation beginnt. (7) Die neu synthetisierten DNA-Moleküle können als Template fungieren und einen weiteren DNA-Replikationsprozess auslösen. (8/9) Für die Transkription der mittleren Gene werden frühe virale und zelluläre Proteine benötigt und ermöglichen daraufhin die Translation der mittleren Gene. (10) Die neu synthetisierte DNA wird für die Transkription der späten Gene wiederum als Template verwendet und die mittleren Proteine dienen dabei als Transaktivatoren für die Transkription. (11) Die späten Gene kodieren für Komponenten der Viruspartikel sowie für frühe Initiationsproteine. (12) Zusammenbau der Virus-Partikel und Verpackung der viralen DNA. (13) Bildung von „immature“ Viruspartikeln (IV). (14/15) Reifung der IV-Partikel zu „intracellular mature“ Viruspartikeln (IMV). Die Freisetzung erfolgt durch Zelllyse. (16) Umhüllung der IMV mit einer zusätzlichen Membran vom Trans-Golgi-Apparat oder von Endosomen und Synthese der „intracellular enveloped“ Viruspartikel (IEV). (17) Die IEV werden an die Zellmembran transportiert, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren und dadurch ihre äußere Membran verlieren. Einige dieser Viren werden als „extracellular enveloped“ Viruspartikel (EEV) in die zelluläre Umgebung entlassen. (18) Andere verbleiben an der Zelloberfläche. Diese „cell-associated enveloped“ Viruspartikel (CEV) können durch Reorganisation des zellulären Aktin-Zytoskeletts benachbarte Zellen infizieren. Quelle: Flint *et al*, 2003 [15]

1.1.5 Replikation und Morphogenese

Der Replikationszyklus von OPV ist wie bei anderen Viren gekennzeichnet durch den Eintritt der Viren in die Zelle, die Replikation und die Übertragung der Viren auf andere Zellen. Der intrazelluläre Replikationszyklus ist am besten für das VACV beschrieben, doch sind essentielle Schritte der Replikation bei Pockenviren stark konserviert [12]. Ein Überblick über die Infektion der Zelle mit VACV bis hin zur erfolgreichen Replikation der Viren ist in Abb. 2 dargestellt.

1.1.5.1 Zelleintritt

Der Infektionszyklus kann durch die zwei verschiedenen infektiösen Virusformen, die IMV- bzw. die EEV-Partikel initiiert werden. Dadurch, dass sich die Partikel sowohl durch die Anzahl der Hüllmembranen als auch durch die Glykoproteine auf der Virusoberfläche (Tab. 2) unterscheiden, wird vermutet, dass sie über unterschiedliche Wege in die Zelle gelangen [16,17]. Entsprechend ihrer Oberflächenproteine binden sie an verschiedene zelluläre Rezeptoren [16], welche zum Großteil noch unbekannt sind. Für drei Oberflächenproteine der IMV ist beschrieben, dass sie an ubiquitär exprimierte Glukosaminoglykane (GAGs) auf der Zelloberfläche binden: *A27L*- und *H3L*-Genprodukte binden an Heparinsulfate [18,19] und D8-Proteine an Chondroitinsulfate [18]. Die Bindung an GAGs stellt die initiale Interaktion zwischen IMV-Partikeln und der Zelle dar, infolgedessen eine Signalkaskade sowie die Ausbildung von Aktin-Fortsätzen auf der Zelloberfläche initiiert und der Viruseintritt begünstigt wird [20].

Von den auf der EEV-Oberfläche lokalisierten Proteinen A34 [21], A56 [22] und B5 [23] wird vermutet, dass sie ebenfalls mit zellulären Rezeptoren interagieren. Bisherige Nachweise wurden indirekt erbracht und müssen noch durch physikalische Interaktionen zwischen EEV-Proteinen und zellulären Oberflächenproteinen bestätigt werden [24].

Die Fusion der Viruspartikel mit der Zellmembran und die damit verbundene Freisetzung des Virus-Cores in das Zytoplasma ist derzeit noch wenig verstanden. Dabei stellt das grundlegende Problem die Anzahl der Hüllmembranen von IMV- und EEV-Partikeln dar. Beschreibungen nach, können IMV von ein, zwei oder auch mehreren Membranen umgeben sein [24]. Abgesehen davon, verfügen EEV immer über eine Membran mehr als IMV. Dadurch bringen beide Virusformen unterschiedliche Voraussetzungen für den Zelleintritt mit. Abb. 3 zeigt eine Übersicht über mögliche Eintrittsmechanismen von IMV- und EEV-

Partikeln. Dabei wird davon ausgegangen, dass die IMV von einer und die EEV von zwei Hüllmembranen umgeben sind.

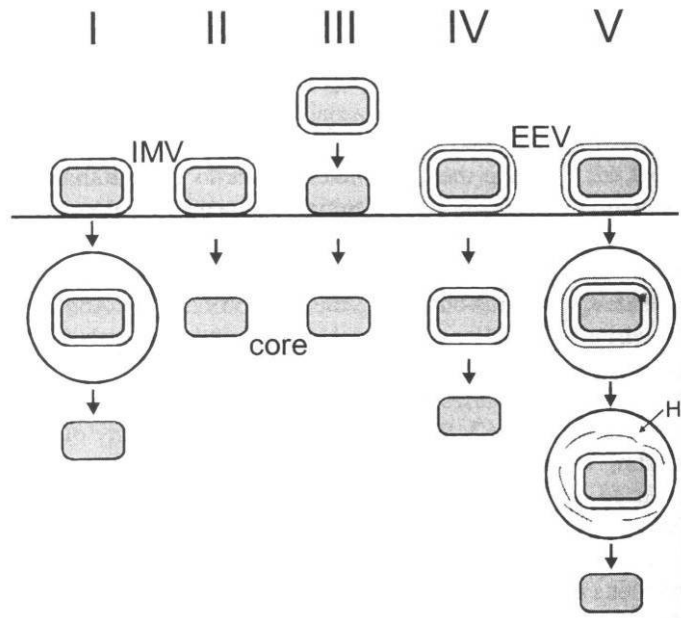


Abb. 3: Mögliche IMV- und EEV-Eintrittsmechanismen. (I) Aufnahme gebundener IMV über Endozytose, Fusion der IMV-Hüllmembran mit der Vesikelmembran und Freisetzung des Cores; (II) Fusion gebundener IMV mit der Plasmamembran und Freisetzung des Cores in das Zytosol; (III) Entfernung der IMV-Hüllmembran außerhalb der Zelle und das Core durchquert die Plasmamembran; (IV) Gebundene EEV fusionieren mit der Plasmamembran und setzen IMV ins Zytosol frei, Verlust der Hüllmembran und Freisetzung des Cores; (V) Aufnahme von EEV über Endozytose, Abbau der äußeren EEV-Membran im sauren Vesikel, Entstehung von IMV, Fusion der IMV mit Vesikelmembran und Freisetzung des Cores ins Zytosol. Quelle: Smith *et al*, 2003 [24]

1.1.5.2 Genexpression

Die Expression des Pockenvirusgenoms ist streng reguliert und in drei aufeinanderfolgende Phasen gegliedert: die frühe (early), mittlere (intermediate) und späte (late) Transkription.

frühe Transkription

Innerhalb von 20 Minuten nach der Infektion (post infectionem, p. i.) der Zelle und der Freisetzung des Virus-Cores in das Zytoplasma beginnt noch im Core selbst die Transkription der frühen Gene [12]. Dies wird dadurch ermöglicht, dass in der späten Phase der Infektion einer Zelle das vollständige Transkriptionssystem für die Expression der frühen Gene in das Core verpackt und mit dem Viruspartikel aus der Zelle freigesetzt wird [12]. Zu dem Transkriptionssystem zählen eine Reihe Virus-kodierter Enzyme wie die DNA-abhängige RNA-Polymerase, der frühe Transkriptionsfaktor VETF oder das „nicking-

joining“-Enzym (*K4L*) [25]. VETF ist ein Heterodimer aus den viralen Genprodukten *D6R* und *A7L* [26,27].

Die Synthese der frühen mRNA beginnt mit der Bindung des Transkriptionsfaktors VETF an die Promotorsequenz der frühen Gene, wodurch die virale DNA-abhängige RNA-Polymerase rekrutiert und die Transkription gestartet wird [28,29]. In dieser Phase wird etwa die Hälfte des viralen Genoms transkribiert, wobei maximale Syntheseraten ein bis zwei Stunden p. i. erreicht werden [30,31]. Die frühe mRNA wird zur Synthese von viralen Proteinen verwendet, die unter anderem an der DNA-Replikation oder der Transkription der mittleren Gene (Transkriptionsfaktoren) beteiligt sind [25]. Eine besondere Klasse der frühen Gene sind die sogenannten Immunmodulatoren, auf welche unter 1.1.6 gesondert eingegangen wird. Frühe Proteine induzieren ebenso das Uncoating des Virus-Cores. Dadurch wird die virale DNA freigesetzt, die frühe Transkription herabreguliert und die virale DNA-Replikation beginnt, umgeben von den Membranen des endoplasmatischen Retikulums [24].

mittlere Transkription

Im Anschluss an die DNA-Replikation folgt die Transkription der mittleren Gene. Die ersten Transkripte können ca. 100 Minuten p. i. detektiert werden, wenn die frühe Transkription ihr Maximum erreicht hat [31]. Derzeit sind sieben mittlere Gene bekannt, wobei drei davon, *G8R*, *A1L* sowie *A2L*, für Transaktivatoren der späten Transkription kodieren [32]. Einer Hypothese zufolge wird angenommen, dass die auf dem Virus-Genom lokalisierten mittleren und späten Gene in den infektiösen Viruspartikeln unzugänglich für das im Virus-Core verpackte Transkriptionssystem sind und die DNA-Replikation deshalb erst im Anschluss an die frühe Transkription erfolgt. Die DNA steht dadurch als Template für die darauffolgende Expression der mittleren Gene zur Verfügung [12].

späte Transkription

Die Transkription der späten Gene startet ca. zwei Stunden p. i. durch die Bindung der späten Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Promotorsequenzen. Es wurden drei Transkriptionsfaktoren identifiziert, von denen *in vitro* gezeigt wurde, dass sie essentiell für die Transkription der späten Gene sind [32]. Diese wurden als VLTF-1 (*G8R*) [33], VLTF-2 (*A1L*) [34] und VLTF-3 (*A2L*) [35] bezeichnet, wobei VLTF für „VACV late transcription factor“ steht. Die Transkription der späten Gene erfolgt kontinuierlich über einen Zeitraum

von 48 Stunden. Dies ist einerseits notwendig, da die späten mRNAs nur eine Halbwertszeit von ca. 30 Minuten besitzen [30,36]. Andererseits können sich während dieser Zeit große Mengen an viralen Proteinen ansammeln. Dazu zählen beispielsweise Strukturproteine, die für den Aufbau der Viruspartikel benötigt werden. In dieser Phase werden aber auch virale Enzyme wie die DNA-abhängige RNA-Polymerase oder Transkriptionsfaktoren synthetisiert [12].

Insgesamt erfolgt die zeitliche Regulation der verschiedenen Phasen der Expression durch spezifische Promotorsequenzen. Gene, die über den gesamten Replikationszyklus exprimiert werden, besitzen folglich auch alle drei Promotorsequenzen, welche nacheinander angeordnet sind. Die Transkriptionsfaktoren für die nächste Phase werden jeweils in der vorangegangenen gebildet [37].

1.1.5.3 DNA-Replikation

Die DNA-Replikation erfolgt ca. ein bis zwei Stunden p. i. im Anschluss an die Transkription der frühen Gene in den sogenannten Virusfabriken [38]. Der molekulare Ablauf der DNA-Replikation ist noch nicht gut verstanden. Man nimmt jedoch an, dass die Replikation durch ein oder zwei Einzelstrangbrüche (Abb. 4) in der Region der ITRs ausgelöst wird. Dabei dienen die freien 3'-Enden als Primer für die Replikation des freiliegenden Einzelstranges. Nach Rückfaltung der bereits replizierten DNA wird das restliche Genom kopiert, wobei es aufgrund der Hairpinstruktur an den Genomenden zur Ausbildung von Konkatemeren kommt. Wird bereits vor Abschluss der DNA-Replikation ein neuer Zyklus begonnen, so liegen sehr große, verzweigte Konkatemere vor [39].

Das OPV-Genom kodiert auch für Enzyme, die für den Nukleotidbiosynthese-Metabolismus oder für die virale DNA-Replikation benötigt werden. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass das durch den ORF *K4L* kodierte Protein an der Auflösung der Konkatemerstrukturen beteiligt ist, da es über „Schneide-“ und „Klebe-“ Eigenschaften verfügt. Es wird daher auch als „nicking-joining“ Enzym bezeichnet und am Ende der Virus-Replikation im Virus-Core verpackt [40,41,42].

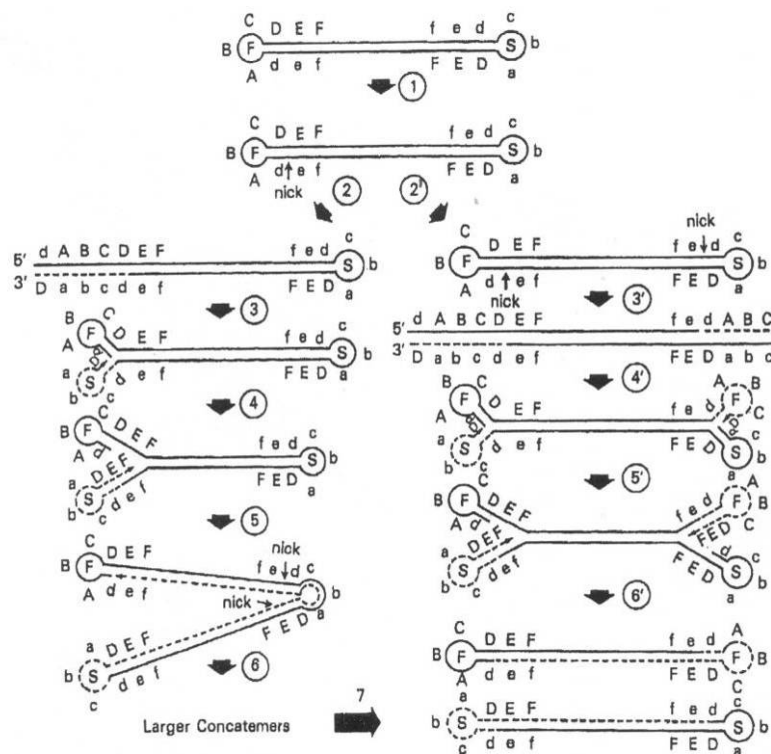


Abb. 4: Self-Priming Modell für die DNA-Replikation von VACV. Das Schema auf der linken Seite zeigt die DNA-Replikation initiiert durch einen Einzelstrangbruch an einem Genomende über die Ausbildung von Konkatemeren. Das auf der rechten Seite beschreibt die Replikation über zwei Einzelstrangbrüche ohne Konkatemerauflösung. (1) Einzelstrangbruch; (2) Verlängerung; (3) Self-Priming am Loop; (4) Uni-direktionale Verlängerung; (5) Konkatemerauflösung; (6) Ausbildung großer Konkatemere, wenn vor Ende der Replikation ein neuer Zyklus startet; (7) Produkte der Replikation; (2') zweiter Strangbruch; (3') Verlängerung; (4') Self-Priming am Loop; (5') Uni-direktionale Verlängerung; (6') Produkte der Replikation. Die am VACV-Genomende befindlichen ITRs werden hier mit F und S bezeichnet. Quelle: Moss *et al*, 1983 [39]

1.1.5.4 Morphogenese

Der Zusammenbau der infektiösen Viruspartikel erfolgt wie die DNA-Replikation und die Transkription der mittleren und späten Gene ebenfalls in den Virusfabriken im Zytoplasma der Zelle, die elektronenmikroskopisch als elektronendichte Strukturen sichtbar sind. Als erste definierte Strukturen erscheinen die als „crescents“ bezeichneten halbmondförmigen Membranstrukturen an den Rändern der elektronendichten Strukturen, die bereits virale Proteine enthalten. Die Herkunft dieser Membranen ist umstritten. Einerseits wird angenommen, dass diese Lipidmembran aus einer *de novo* Synthese [43] und andererseits aus bestehenden Membranen hervorgeht [44]. Im Laufe der Morphogenese reifen die „crescents“ zu sphärischen „immature“ Viruspartikeln (IV) heran. Diese enthalten bereits das virale Genom und sind nicht infektiös. Erst durch proteolytische Prozessierung der Capsidproteine und der Kondensation des Virus-Cores erfolgt die Reifung zum infektiösen

reifen (engl., mature) Viruspartikel (IMV) [12]. Die meisten IMV-Partikel verbleiben in der Zelle und werden erst durch die Zelllyse freigesetzt. Einige IMV werden jedoch über Tubulinfilamente zum Mikrotubuli-Organisationszentrum transportiert und entweder mit Membranen vom Trans-Golgi-Apparat oder von Endosomen umhüllt. Dadurch entstehen die „intracellular enveloped“ Viruspartikel (IEV) [45]. Die verschiedenen infektiösen Viruspartikel unterscheiden sich nicht nur durch die Anzahl der Hüllmembranen, sondern auch durch die auf der äußeren Membran exponierten Oberflächenproteine (Tab. 2).

Der Transport der IMV aus den Virusfabriken erfordert nicht nur die Mikrotubuli sondern auch das VACV-Protein A27 (*A27L*). Dieses ist als Trimer mit A17 und A14 über Proteininteraktionen auf der Oberfläche von IMV-Partikeln verankert [46,47]. A27 ist ein multifunktionales Protein, welches in das Attachment der IMV-Partikel [48], die Virus-Zell-Fusion [49], die Zell-Zell-Fusion [50] und in die Umhüllung der IMV zu IEV beteiligt ist.

Die IEV werden durch Tubulinfilamente an die Zellmembran transportiert [51]. Dort fusioniert die äußere Membran der IEV mit der Zellmembran und exponiert infektiöse „cell-associated enveloped“ Viruspartikel (CEV) auf der Zelloberfläche. Einige Partikel bleiben zell-assoziiert, andere werden in die Umgebung der Zelle freigesetzt. Diese werden als „extracellular enveloped“ Viruspartikel (EEV) bezeichnet [12].

Die Verbreitung der Pockenviren innerhalb eines Wirtes erfolgt über die CEV- und EEV-Partikel. Benachbarte Zellen werden dabei von CEV infiziert, die durch auf der Zellmembran ausgelöste Aktinfortsätze ihre Zielzellen erreichen [52]. EEV gelangen als freie Viruspartikel in Suspension zu weiter entfernten Zielzellen [53]. Dahingegen werden neue Wirte über Aerosol durch IMV-Partikel infiziert. Dies ist möglich, da sie gegenüber Umgebungstemperaturen und Austrocknung stabiler sind als CEV und EEV, deren Membranen leicht durch physikalische Einflüsse zerstört werden können [24].

1.1.6 Immunmodulation

OPV kodieren für eine Reihe von akzessorischen Proteinen, mit denen sie nicht nur ihre Virulenz modulieren können, sondern sich vielmehr optimal an Wirtszellen und -organismen anpassen können. Ihre Wirtsspezifität ist demnach abhängig von effektiven Immunevasionsstrategien, die sich von einem Virus zum anderen unterscheiden können. Eine entscheidende Rolle bei der Immunmodulation spielen die sekretorischen Proteine. Diese binden freie Zytokine und blockieren dadurch deren Wirkungsweise [12]. VACV

bildet z.B. einen löslichen Rezeptor (*B16R*¹), der Ähnlichkeit mit dem Typ II des Interleukin-1-Rezeptors besitzt und mit Interleukin-1 β komplexiert [54]. In infizierten Mäusen verhindert der virale IL-1 β -Rezeptor dann systemische Reaktionen wie Fieber [55]. Bei intranasaler Applikation einer VACV-WR-*B15R*¹-Deletionsmutante wurde die Virulenz dieses Virus in Mäusen erhöht [54]. VACV-Stämme, denen das *B16R*-Gen fehlt, wiesen ferner eine höhere Anzahl postvakzinaler Komplikationen auf [55]. Der virale IL-1 β -Rezeptor ist bei VARV fragmentiert und damit nicht funktionsfähig. Dies könnte erklären, warum dieses Virus so virulent ist.

Ein weiteres sekretiertes Protein der Pockenviren wird von dem Gen *C12L*² kodiert und bindet das proinflammatorische Zytokin IL-18. Dadurch werden sowohl die Interferon (IFN)- γ -Produktion als auch die Aktivierung der NK- und T-Zellen inhibiert [56]. Das VACV-Protein E3 (*E3L*) unterbindet dahingegen die IFN- α und - β induzierte Signalkaskade. Während der Virusreplikation wird als ein Nebenprodukt doppelsträngige RNA (dsRNA) gebildet, wodurch die Bildung von IFN- β induziert wird [57]. Neu synthetisiertes IFN- β bindet an den Typ I IFN-Rezeptor auf der Zelloberfläche und aktiviert dadurch den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg, wodurch die Ausschüttung von IFN- α und - β zur Aktivierung der spezifischen, cytotoxischen T-Zellantwort vermittelt wird [58]. E3 kann die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 blockieren und inhibiert dadurch die Aktivierung der für die IFN- β Expression benötigten Transkriptionsfaktoren. Folglich ist die gesamte IFN- α und - β Signalkaskade unterbrochen. Ferner wird durch die Bindung des E3-Proteins an dsRNA die Aktivierung der dsRNA-abhängigen Enzyme PKR und OAS verhindert.

Zusätzlich zu den bisher erwähnten Proteinen wurden homologe Sequenzen zu TNF-Rezeptoren identifiziert. Bisher sind vier verschiedene virale TNF-Rezeptoren bekannt, die mit CrmB (*B28R*), CrmC (*A53R*), CrmD (*crmD*³) und CrmE (*K3R*⁴) (engl., Crm, cytokine responsive modifying protein) bezeichnet werden [59,60]. Die viralen TNF-Rezeptoren unterscheiden sich von den zellulären durch die fehlenden Transmembran- sowie die zytoplasmatische Signaldomäne [60]. Dadurch können sie als lösliche Zytokinrezeptoren z.B. im Blut entweder TNF- α , TNF- β oder beide TNF-Formen binden und infolgedessen die Signaltransduktion über den zellulären TNF-Rezeptor verhindern. Virale TNF-Rezeptoren wurden bei verschiedenen OPV-Spezies identifiziert, doch kodieren deren Genome nicht für alle Rezeptoren [61].

¹ *B16R* bei VACV-CP entspricht *B15R* bei VACV-WR oder *B14R* bei anderen OPV. ² Die Nomenklatur bezieht sich für das Gen *C12L* auf VACV-WR, ³ für *crmD* auf CPXV sowie für ⁴ *K3R* auf CPXV-GRI.

Tab. 2: Bekannte Proteine auf der Oberfläche von IMV-, IEV-, CEV- und EEV-Partikeln [45,46,62,63]

IMV	IEV	CEV und EEV
A14 (<i>A14L</i>)	A33 (<i>A33R</i>)	A33 (<i>A33R</i>)
A17 (<i>A17L</i>)	A34 (<i>A34R</i>)	A34 (<i>A34R</i>)
A27 (<i>A27L</i>)	A36 (<i>A36R</i>)	A36 (<i>A36R</i>)
D8 (<i>D8L</i>)	A56 (<i>A56R</i>)	A56 (<i>A56R</i>)
H3 (<i>H3L</i>)	B5 (<i>B5R</i>)	B5 (<i>B5R</i>)
	F12 (<i>F12L</i>)	
	F13 (<i>F13L</i>)	F13 (<i>F13L</i>)

1.2 Vakzination und Therapieansätze zum Schutz vor Pockenviren

Die durch das VARV verursachte Pockenerkrankung war ursprünglich auf dem indischen Subkontinent und in China verbreitet. Im Mittelalter gelangte das Virus nach Afrika und Europa und im 16. Jh. nach Amerika. Alle vier bis sieben Jahre kam es zu einer seuchenartigen Ausbreitung des VARV, bei der zehn bis 40 Prozent der erkrankten Personen starben [1].

Nachdem man erkannt hatte, dass eine künstliche Infektion mit VARV zu einem milderen Krankheitsverlauf, führte, wurde bereits im 10. Jh. die so genannte Variolation als Schutz gegen Pockenviren in China angewendet. Zu Beginn des 18. Jh. wurde die Variolation in Europa eingeführt und 1798 durch die Vakzination mit CPXV durch E. Jenner abgelöst [1]. Anfang des 19. Jh. entwickelten Troia und Galbiati eine Methode, um den Impfstoff gegen humane Pockenviren auf der Haut von Kälbern zu produzieren. Diese Dermovakzinen wurden dann weltweit unabhängig voneinander hergestellt, wodurch verschiedene VACV-Impfstämme hervorgingen, die zu unterschiedlichen postvakzinalen Komplikationen führen konnten [1]. Die VACV-Stämme Lister und NYCBH (New York City Board of Health) wurden weltweit am häufigsten für die Vakzination eingesetzt und wiesen im Vergleich zu anderen VACV-Stämmen die geringsten Nebenwirkungen auf [1]. Drei Jahre nach der letzten bekannten Pockenerkrankung in Somalia (1977) erklärte die WHO die Welt für pockenfrei und weltweite Impfprogramme wurden eingestellt [1].

Seit den Terroranschlägen vom 11. September 2001 sowie dem gezielten Versenden von Anthraxsporen in den USA gibt es Befürchtungen, dass auch humane Pockenviren als bioterroristische Waffe eingesetzt werden könnten [64]. Heutzutage liegt in der Bevölkerung

kein ausreichender Impfschutz vor und Therapiemöglichkeiten fehlen bisher. Die Wiedereinführung der Pockenschutzimpfung wurde verworfen, da die Vakzination häufig und insbesondere bei immunsupprimierten Personen zu Impfkomplicationen führt [65,66]. Dieses Risiko wurde schon in den 70er Jahren erkannt und mit der Entwicklung von attenuierten Vakzinen begonnen. Der bekannteste attenuierte Impfstamm ist VACV-MVA (Modified Vacciniavirus Ankara), welcher durch 574 Passagen in embryonalen Hühnerfibroblasten aus einem türkischen Dermovakzine-Stamm hervorgegangen ist. Ende der 70er Jahre wurde VACV-MVA als Vorimpfung bei ca. 150.000 Personen zur Vermeidung von Impfkomplicationen eingesetzt [67,68]. Bislang ist unbekannt, ob VACV-MVA einen Impfschutz gegen VARV bietet, obgleich Primaten durch VACV-MVA vor einer letalen MPXV-Infektion geschützt wurden [69].

Aktuell werden neben attenuierten Impfstämmen alternative Therapiemethoden entwickelt. Beispielsweise inhibiert das Nukleotidanalogen Cidofovir die Replikation von OPV *in vitro* und *in vivo* [70,71]. Cidofovir ist bisher nur für die Behandlung von Cytomegalovirus-Infektionen am Menschen zugelassen und seine pharmakologischen Eigenschaften sind gut dokumentiert, so dass es zur Behandlung einer Pockeninfektion am Menschen eingesetzt werden könnte. Dennoch kann eine therapeutische Wirkung von Cidofovir gegen das VARV im humanen System nicht garantiert werden [64]. Zudem weist diese Substanz eine hohe Nephrotoxizität auf. Vielversprechender ist die von der Firma SIGA Technologies entwickelte Verbindung ST-246, welche die Virusausbreitung von allen bisher untersuchten OPV-Spezies einschließlich des VARV in Zellkultur inhibieren konnte [72,73]. In Tierversuchen schützte ST-246 Mäuse vor einer letalen Infektion mit VACV, CPXV und ECTV [74] sowie MPXV-infizierte Erdhörnchen (*Xerus inauris*). Eine Infektion nicht-humaner Primaten mit VARV konnte ebenfalls erfolgreich behandelt werden [75]. 2007 wurde ST-246 einmalig für die Behandlung einer lebensbedrohenden VACV-Infektion eines zwei Jahre alten Jungen eingesetzt, der die Infektion daraufhin überlebt hatte [76].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz für die Behandlung von OPV-Infektionen ist die Verwendung von DNA-Aptameren. In neueren Untersuchungen wurde ein 64 Basen langes DNA-Aptamer (A38) identifiziert, dass spezifisch an OPV bindet und *in vitro* die Infektion inhibiert [77]. Ob A38 die Ausbreitung von OPV *in vivo* verhindern kann, muss noch untersucht werden. Weiterhin kann die Replikation von verschiedenen Viren spezifisch durch Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-Analoga wie Antisense-Oligonukleotide [78,79],

siRNAs [80,81] und Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere [82] inhibiert werden. Mit der Anwendung dieser Technologien könnten neue Möglichkeiten für Therapien gegen OPV eröffnet werden.

1.3 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Mechanismus in eukaryontischen Zellen, durch welche die Genexpression sequenzspezifisch und posttranskriptionell durch kurze dsRNA-Moleküle inhibiert wird [83]. Die RNAi wird von dsRNA unterschiedlicher Länge ausgelöst. In natürlicher Umgebung kann dsRNA von RNA-abhängigen Polymerasen bei Viren oder durch das Hybridisieren von überlappenden Transkripten bei Transposons entstehen und führt normalerweise zum Abbau durch die dsRNA-spezifische RNase-III-Endonuklease „Dicer“ [84,85]. Dadurch entstehen kurze dsRNA-Moleküle mit einer Länge von 21-28 Nukleotiden, die siRNAs [84]. Ein gegenwärtiges Modell zum Wirkungsmechanismus der RNAi geht davon aus, dass doppelsträngige siRNA durch eine Helikase entwunden und nur ein Strang der siRNA in den Vorläufer-„RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut wird [86]. Der aktivierte RISC-Komplex besteht aus einer einzelsträngigen RNA, Proteinen der *Argonauten*-Gen-Familie sowie anderen bisher nicht charakterisierten Faktoren einschließlich der Endonuklease, die für den Abbau der Ziel-mRNA verantwortlich ist [87,88,89]. Die Aktivität von RISC ist ATP-abhängig. Eventuell wird diese Energie von RNA-Helikasen benötigt, um die siRNA-Komplexe zu trennen und Strukturumlagerungen durchzuführen [86,88]. Ist die RNA aus dem RISC-Komplex komplementär zur Sequenz der Ziel-mRNA, so initiiert der RISC-Komplex den Abbau dieser mRNA in der Mitte der homologen Sequenz (Abb. 5).

dsRNA oder siRNA kann auch synthetisch hergestellt werden, um die Genexpression gezielt *in vitro* oder *in vivo* zu inhibieren. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten: (a) die direkte Synthese von spezifischen siRNAs [90], (b) Synthese von langer dsRNA und Verdau durch Dicer zu einer Mischung von kurzen dsRNAs, auch als ShortCut siRNA bezeichnet [91], (c) Herstellung von Vektor-kodierter short hairpin RNA (shRNA) [92]. Die siRNA und ShortCut siRNA sind nach der Transfektion in der Zelle sofort einsatzbereit, wohingegen die shRNA nach der Transfektion des Vektors erst noch exprimiert werden muss, bevor sie mit dem RISC-Komplex interagieren kann.

Auf der Grundlage der RNAi wurde in einer Vielzahl von Zellen die Funktion von Genen mit spezifischen siRNAs untersucht und *in vitro* als auch *in vivo* virale Infektionen erfolgreich behandelt [80,81,90,93,94,95]. Diese Technologie könnte ebenso eingesetzt werden, um die Funktion von OPV-Genen zu studieren oder eine Infektion mit OPV zu therapieren.

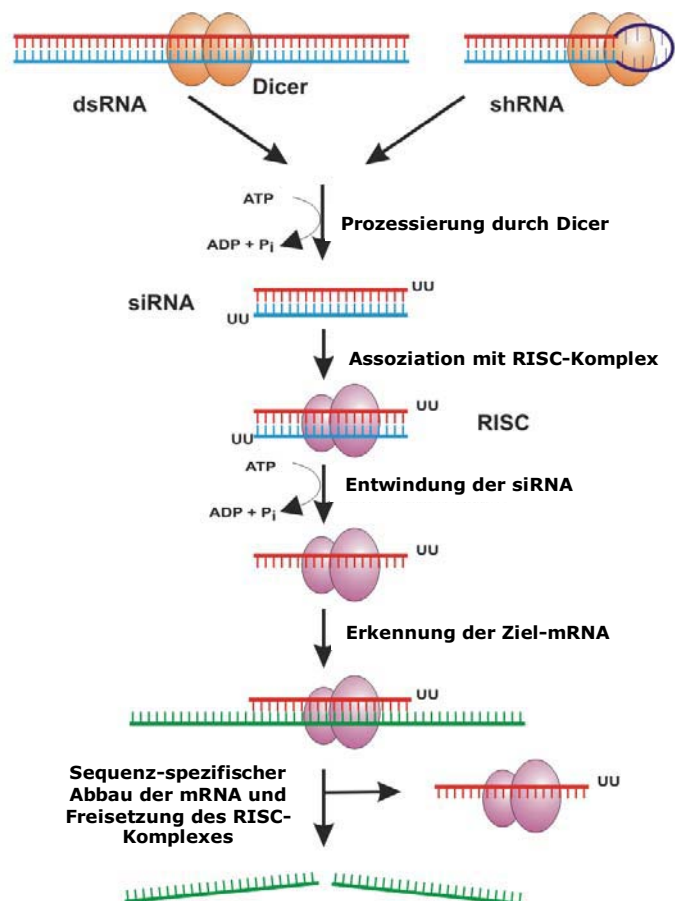


Abb. 5: Prinzip der RNAi. Doppelsträngige RNA (>30bp) wird in einem ATP-abhängigen Prozess durch Dicer zu „small interfering“ RNAs (siRNA) mit einer Länge von ca. 21-28 Nukleotiden prozessiert. Die siRNAs haben jeweils am 3'-Ende zwei Nukleotidüberhänge. „Short hairpin“ RNAs (shRNA), welche entweder endogen oder von viralen Vektoren exprimiert werden, werden ebenso von Dicer zu siRNAs prozessiert. Eine ATP-abhängige Helikase entwindet die doppelsträngige siRNA, so dass nur ein Strang an den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) bindet. Der aktivierte RISC-Komplex bindet an die komplementäre Sequenz auf der Ziel-mRNA und induziert den Abbau dieser mRNA. Quelle: Rutz *et al*, 2004, verändert [96]

1.4 Ziele der Arbeit

Aktuell wird nicht nur das zoonotische Potential pathogener Pockenviren sondern auch die potentielle Verwendung als bioterroristischer Kampfstoff als eine erhebliche Gefahr für die Menschen diskutiert. Therapeutische Ansätze sind deshalb von großem Interesse, da in der Bevölkerung kein ausreichender Impfschutz vorhanden ist. Momentan steht zur Prophylaxe nur die Vakzination zur Verfügung, von welcher bekannt ist, dass mit den bisher zugelassenen Impfstoffen starke Nebenwirkungen assoziiert sind. Zur Therapie sind bisher keine Medikamente zugelassen. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob durch den Einsatz von siRNA eine Methode entwickelt werden kann, mit welcher virale Gene, die für die Replikation von OPV essentiell sind, charakterisiert werden können. Damit könnten auch potentielle Targets für die Entwicklung neuer Therapeutika identifiziert werden. Um potentielle Kandidatengene für die Inhibition der Virusreplikation mit siRNA zu bestimmen, sollte die Expression von ausgewählten Genen verschiedener OPV analysiert werden. Anschließend sollte sowohl ein siRNA-System zur Hemmung von OPV-Genen als auch ein Versuchsaufbau etabliert werden, der effektiv zur RNAi führt. Die Auswirkungen der RNAi sollten dann für jedes Zielgen auf Transkriptions- und Translationsebene überprüft und in Hinblick auf die Hemmung der Virusreplikation untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Technische Geräte

Geräteart	Typ	Hersteller
Brutschrank für Bakterien	B6030	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, DE
Brutschrank für Zellkultur	B5060EC/CO ₂	ABgene, Epsom, GB
Combi Thermo-Sealer		Gibco BRL, Eggenstein, DE
Gel-Elektrophorese-Kammer	Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus Horizon 58	
Gel-Photokamera	E.A.S.Y. 429K	Herolab GmbH, Wiesloch, DE
Gel-Phototisch	E.A.S.Y. RH-3	
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, DE
Blockthermostat	BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, DE
Lichtmikroskop	TELAVAL 31	Carl Zeiss Jena GmbH
Neubauer-Zählkammer		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pipetten	10 bis 1000 µl	Gilson International B.V., Limburg-Offheim, DE; Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetboy		VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Power Supply	Electrophoresis Power Supply PHERO-Stab 500	Gibco BRL
Protein Gel-Elektrophorese-Kammer	Mini-V 8.10	
Protein-Elektro-Blot-Kammer	Fast Blot 334	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, DE
Schüttelapparat	3011	GFL GmbH, Burgwedel, DE
Sequencer	ABI-PRISM Sequencer 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems Inc, Foster City, US
Sicherheitswerkbank		BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, DE
TaqMan-Geräte	ABI Prism™ 7700 Sequence Detector 7900HT Sequence Detection System Mx3000	PE Applied Biosystems, Foster City, US
Thermomixer	5438	Stratagene, La Jolla, US
Thermozykler	PTC-200	Eppendorf AG
	GeneAmp PCR System 9700	MJ Research Inc., San Francisco, US
	GeneAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems
	Mastercycler epgradient	Eppendorf AG
Wasserbad	bc	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, DE
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Centrifuge 5415C Varifuge 3.0R Megafuge 3.0R Heraeus Fresco 21 Centrifuge Sorvall WX Ultra 80	Eppendorf AG Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, DE Thermo Scientific, Karlsruhe, DE Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, US

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,2 ml Thermo-Tube	ABgene, Epsom, GB
1,5 ml, 2 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg, DE
25 cm ² -, 75 cm ² -, 175 cm ² -Zellkulturflaschen mit Filter Caps	Nunc, Wiesbaden, DE
6-, 24-, 48-, 96- Well-Platten für Zellkultur	Nunc
96-Well-Platten für PCR, Thermo-Fast 96, non skirted	Applied Biosystems Inc, Foster City, US
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Diagnostika Objektträger-Standard	Carl Roth GmbH
Einmalspritzen (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einwegpipetten (1- 50 ml)	Nunc
Glasware	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, DE
Kryogefäße (1,8 ml mit Innengewinde)	Nunc
Nitrocellulose Transfer Membran Protean BA83	Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel, DE
Parafilm	Carl Roth GmbH
Pipettenspitzen, aerosolgeschützt 10- 1000 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Pipettenspitzen, ohne Aerosolschutz 10- 1000 µl	Eppendorf AG
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore Corporate, Massachusetts, US
Whatman-Papier GB003	Schleicher & Schuell Bioscience GmbH
X5151 Heat Seal Film	ABgene
Zellkulturschalen (60 x 15 mm, 150 x 20 mm)	Renner GmbH, Dannstadt, DE
Zellschaber (24 cm)	Renner GmbH
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Nunc

2.3 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen (Tab. 3) wurden in einem Brutschrank bei 37°C und in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die adhärenenten Zellen 293, HEp-2, Huh-7, A-549 und Vero E6/7 wurden zweimal pro Woche 1:3 bis 1:6 umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,08 %/0,13 %) vom Zellkulturboden gelöst und nach Resuspendierung auf neue Flaschen verteilt. CEF-Zellen wurden mit 0,25 % igem Trypsin abgelöst. Die Suspensionszellen HSB-2 wurden zwei bis dreimal pro Woche 1:3 umgesetzt. Für alle Versuche wurden die Zellen vor der Aussaat in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Es wurden nur Mykoplasmafreie Zellen verwendet, wofür der Zellkulturüberstand regelmäßig in der PCR überprüft wurde [97].

Tab. 3: Verwendete Zellen

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Herkunft
293	human, embryonale Niere, transformiert mit Ad 5	D-MEM + 5 % FKS + 200 mM Glutamin	Robert Koch-Institut, Berlin, DE
HEp-2	human, Kehlkopfkarzinom, HeLa kontaminiert	D-MEM + 5 % FKS + 200 mM Glutamin	Robert Koch-Institut
A-549	human, Lungenkarzinom	D-MEM + 10 % FKS + 200 mM Glutamin	Robert Koch-Institut
Huh-7	human, Leberzellkarzinom	D-MEM + 10 % FKS + 200 mM Glutamin	Robert Koch-Institut
HSB-2	human, T-Zell-Leukämie	RPMI-1640 + 10 % FKS	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ACC 435
Vero E6/7	Afrikanische Grüne Meerkatze, Nierenzellen	D-MEM + 10 % FKS + 200 mM Glutamin	Robert Koch-Institut
CEF	embryonale Hühnerfibroblasten	D-MEM + 5 % FKS	Eigenherstellung

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, „ohne Ca^{2+} und Mg^{2++}): 8 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na_2HPO_4 , 2,4 g KH_2PO_4 , ad 1 l bidest.- H_2O , pH 7,4. Alle Chemikalien wurden von Merck KGaA (Darmstadt, DE) bezogen.

D-MEM, Dulbecco's Modified Eagles Medium (Gibco BRL, Eggenstein, DE), RPMI-1640, Rosewell Park Memorial Institute 1640 Medium (Gibco BRL), FKS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE), Glutamin (Biochrom AG, Berlin, DE), Trypsin (PAA, Laboratories Gesellschaft M. B. H., AT), EDTA (Merck KGaA)

2.4 Präparation von embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF-Zellen)

Von elf Tage alten Hühnerembryonen wurden in einer Petrischale mit einer Schere Kopf, Extremitäten und Innereien des Embryos entfernt. Der Rumpf wurde zerkleinert, in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml 0,025 % iger Trypsinlösung überführt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde erneut in 10 ml Trypsinlösung aufgenommen, in einen Erlenmeyerkolben überführt und die Suspension 30 Minuten mit einem Magnetrührer langsam gerührt, um die Zellen zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Röhrchen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 10 Minuten bei 216 g (Varifuge 3.0R) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Medium (D-MEM + 5% FKS) aufgenommen, die Zellen resuspendiert und in einem Aliquot mit der Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt. $1,5 \times 10^6$ embryonale Hühnerfibroblasten (CEF, engl. chicken embryo fibroblast) wurden in 5 ml Medium pro 25cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach 2 bis 3 Tagen zur weiteren Vermehrung umgesetzt.

2.5 Virusanzucht

Für die Vermehrung von Calpoxvirus, Vacciniavirus Lister-Elstree (VACV-LE) und Kamelpockenviren CP-19 (CMLV-CP-19) wurden 2×10^7 HEp-2-Zellen in 30 ml Medium pro 175 cm²-Zellkulturflasche ausgesät (Tab. 4). Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 0,1 bis 0,5 MOI in einem Volumen von 10 ml Medium infiziert und eine Stunde inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit 30 ml Medium überschichtet und für 3 bis 5 Tage inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und im Zellkulturüberstand resuspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 216 g (Varifuge 3.0R) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Um die Zellen aufzuschließen und Viruspartikel freizusetzen, wurde das Zellpellet 30 Minuten bei -80°C eingefroren und anschließend in 5 bis 10 ml Überstand aufgenommen, intensiv gevortext und in dem restlichen Überstand resuspendiert. Zur Erhöhung der Viruskonzentration, wurde das Virus in der Ultrazentrifuge 3 Stunden bei 3400 g (Sorvall WX Ultra 80, Rotor R19) durch ein 30 % iges Sucrosekissen pelletiert. Das Viruspellet wurde in Medium (1/10 Volumen der Ausgangsmenge) aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Das Vacciniavirus Modified Vacciniavirus Ankara (VACV-MVA-BN) wurde mit 0,1 MOI auf CEF-Zellen angezüchtet (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete OPV

Bezeichnung	Besonderheit	Herkunft
VACV-LE	Impfstamm, Referenz 5/79	Berna Biotech AG, Bern, CH
VACV-MVA-BN	nicht zugelassener Impfstoff, BN-MVA, 070602	Bavarian Nordic GmbH, Martinsried, DE
CMLV-CP-19	2. Passage auf Vero-Zellen, 1994	Ludwig-Maximilians-Universität, München, DE, Dr. Eßbauer
Calpoxvirus	aus der Haut eines infizierten Weißbüschelaffen <i>Callithrix jacchus</i> isoliert, 2002 [7]	Robert Koch-Institut, Berlin, DE

30 % Sucroslösung: 60 g Sucrose, 20 ml 10 x PBS, ad 200 ml bidest.-H₂O, steril filtriert

10 x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ x H₂O, 2 g KH₂PO₄, ad 1 l bidest.-H₂O, pH 7,2

Alle Reagenzien wurden von Merck KGaA (Darmstadt, DE) verwendet.

2.6 Bestimmung des infektiösen Virustiters

2.6.1 Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (PFU)

200 µl Vero E6/7-Zellen ($1,2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden in 24-Loch-Platten verteilt und 200 µl der verdünnten, virushaltigen Überständen zugegeben, die Platten geschwenkt und 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 400 µl CMC-Kulturmedium überschichtet, um die Virusausbreitung auf den direkten Zell-Zellkontakt zu begrenzen. Nach 4 Tagen Kultivierung wurde der Überstand entfernt, die Zellen 20 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd fixiert, 20 Minuten mit Naphtalenblack gefärbt und mit Leitungswasser gewaschen. Die Plaques wurden gezählt und der Virustiter (PFU/ml) unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und der eingesetzten virushaltigen Volumina berechnet.

CMC (Carboxymethylcellulose)-Kulturmedium, 1,6 %: 3,2 g Carboxymethylcellulose (BDH Limited Poole, England), autoklavieren, ad 200 ml Vero E6/7-Zellkulturmedium

Naphtalenblack: 1 g Naphtol Blue Black (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), 13,6 g $C_2H_3NaO_2$ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE), 60 ml $C_2H_4O_2$ (Merck KGaA, Darmstadt, DE), ad 1 l bidest.-H₂O

3,7 % Formaldehyd: 100 ml 37 % Formalin (Carl Roth GmbH), 100 ml 10 x PBS (2.5) , ad 1 l bidest.-H₂O

2.6.2 Bestimmung der Kulturinfektiösen-Dosis 50

Da VACV-MVA-BN in Vero E6/7-Zellen nicht repliziert und somit keinen cytopathischen Effekt (CPE) hervorruft, wurde der Titer mit Hilfe der Endverdünnungsmethode (Kulturinfektiöse-Dosis 50; TCID₅₀: tissue-culture infectious dose 50 %) auf CEF-Zellen ermittelt. 100 µl CEF-Zellen (8×10^5 Zellen/ml) wurden in 96-Loch-Platten verteilt, 24 Stunden kultiviert und 50 µl der seriell 1:10 verdünnten, virushaltigen Überstände auf mediumfreie Zellen pipettiert. Nach einer Stunde wurden weitere 50 µl Medium zu den Zellen gegeben und diese im Zeitraum von 4 bis 5 Tagen täglich unter dem Lichtmikroskop auf einen CPE untersucht. Als keine weitere Veränderung des Zellrasens zu Bemerkens war, wurden die Viruspositiven Wells gezählt und der Virustiter nach Spearman und Kärber [98] berechnet.

Die Berechnung des TCID₅₀:

$$TCID_{50}/ml = D^{(n/p+0,5)} / D_0 \times D \times V$$

D= Verdünnungsfaktor

D₀= erste Verdünnungsstufe

n= Anzahl der positiven Wells

P= Anzahl der Parallelbestimmungen

V= eingesetztes Volumen der Virussuspension

2.7 Infektion von humanen Zelllinien mit OPV

Zur Charakterisierung der OPV-Infektion wurden HEp-2-Zellen mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus bzw. die Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 sowie HSB-2 mit Calpoxvirus infiziert. Die Viren VACV-LE, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus wurden in HEp-2-Zellen vermehrt. Calpoxvirus wurde nach seiner Isolierung bis zur Infektion aller Zelllinien maximal dreimal passagiert, so dass hinsichtlich der verwendeten Zelllinie noch keine Adaptionseffekte aufgetreten sein sollten. VACV-MVA-BN wurde in CEF-Zellen vermehrt. Alle Infektionskinetiken wurden in Einfachwerten durchgeführt und je Infektionsversuch drei nicht infizierte Mock-Kontrollen mitgeführt, die zu den Zeitpunkten t_{0h} , t_{6h} und t_{49h} geerntet wurden.

Von den adhärenenten Zelllinien wurden 2×10^6 Zellen in 3 ml Medium pro Zellkulturschale ($d=60$ mm) ausgesät und am nächsten Tag mit 0,3, 0,03 und 0,003 MOI infiziert. Vor Versuchsbeginn wurde zur Entfernung von RNA 1/20 Volumen RNase A/T1 Mix (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE) zu den unverdünnten Virusstocks pipettiert und das Gemisch 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t_0 wurde beginnend bei den Ansätzen mit den längsten Inkubationszeiten das Medium entnommen und 3 ml der RNase-behandelten Virussuspension auf die Zellen gegeben. In dem t_{0h} -Ansatz wurde die Virussuspension sofort abgenommen, die Zellen 2 x mit 3 ml PBS (0) gewaschen und 3 ml Medium auf die Zellen gegeben. Für die Probenahme wurde der frische Zellkulturüberstand abgenommen, 10 Minuten bei 216 g (Varifuge 3.0R) zentrifugiert und 0,5 ml für die Titration bzw. DNA-Präparation bei -70°C bzw. -20°C eingefroren. $\frac{1}{3}$ des Zellrasens wurden für die DNA-Präparation mit einem Zellschaber gelöst, in 200 μl Medium aufgenommen, 10 Minuten bei 60 g (Heraeus Fresco 21 centrifuge) zentrifugiert und das Zellpellet bei -20°C eingefroren. Die restlichen Zellen wurden in der Zellkulturschale mit 500 μl RLT-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, DE) lysiert und das Lysat bis zur RNA-Präparation bei -70°C eingefroren. Zum Zeitpunkt $t_{0,5h}$ wurden die Proben wie beschrieben geerntet. Alle weiteren Ansätze (t_{1h} , t_{2h} , t_{3h} , t_{6h} , t_{9h} , t_{25h} und t_{49h}) wurden eine Stunde mit dem Virus inkubiert, die Zellen gewaschen, mit 3 ml Medium versetzt und anschließend die Proben, ohne die Zellen noch einmal zu waschen, direkt abgenommen.

Zur Infektion der Suspensionszelllinie HSB-2 wurde je Infektionsdosis eine 75 cm^2 -Flasche vorbereitet, in denen sich je 10 Ansätze á 2×10^6 Zellen/3 ml Medium befanden sowie eine 75 cm^2 -Flasche mit 4 Ansätzen á 2×10^6 Zellen/3 ml Medium für die Kontrollzellen. In

jeder Flasche wurde jeweils ein Reserveansatz mitgeführt. Zu Versuchsbeginn wurde eine 30 ml RNase-behandelte Virussuspension auf die pelletierten Zellen gegeben. Alle Zentrifugationsschritte wurden 5 Minuten bei 312 g (Varifuge 3.0R) und 4°C durchgeführt. Zum Zeitpunkt t_{0h} wurden die Zellen resuspendiert, 3 ml entnommen, das Zellpellet 1 x mit 3 ml PBS gewaschen und in 3 ml Medium aufgenommen. Für die DNA-Extraktion aus dem Zellpellet wurden 0,5 ml pelletiert. Die verbleibenden 2,5 ml wurden zentrifugiert und 0,5 ml Überstand für die Titration bzw. die DNA-Präparation aus dem Überstand verwendet. Der restliche Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl RLT-Puffer aufgenommen und bis zur RNA-Extraktion eingefroren. Mit Ausnahme der t_{0h} - bzw. $t_{0,5h}$ -Werte wurden die infizierten Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, 1 x mit PBS gewaschen und bis zur Probenahme (t_{1h} , t_{2h} , t_{3h} , t_{6h} , t_{9h} , t_{25h} und t_{49h}) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.8 Transfektion von eukaryontischen Zellen

2.8.1 Transfektion mit RNAiFect Transfection Reagent

5×10^4 HEp-2-Zellen wurden in 1 ml Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit ShortCut siRNA transfiziert. Dazu wurden 200 nM siRNA in 100 µl Zellkulturmedium aufgenommen, vermischt und mit 4,8 µl Transfektionsreagenz (RNAiFect; Qiagen GmbH, Hilden, DE) versetzt. In der weiteren Durchführung wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Als Mock-Kontrolle wurden Zellen mit 200 nM einer irrelevanten, „non-silencing“-siRNA (Qiagen GmbH) und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mit 200 nM einer fluoreszenzmarkierten siRNA transfiziert. Die Fluoreszenz wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Transfektionseffizienz mit Hilfe der Axiovision 3.1 Software (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, DE) ermittelt.

2.8.2 Transfektion mit Lipofectamin™ 2000

Die Transfektion von shRNA wurde sowohl in einem Mini-Ansatz in 24-Loch-Platten, als auch in einem Maxi-Ansatz in 6-Loch-Platten, wenn neben RNA auch Proteine in den Zellen nachgewiesen werden sollten, durchgeführt. Es wurden 1×10^5 bzw. 5×10^5 293-Zellen ausgesät und am nächsten Tag in Anlehnung an das Lipofectamin™ 2000-Protokoll (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) transfiziert. Beide Ansätze wurden in Opti-MEM® I-Medium (Gibco BRL, Eggenstein, DE) mit 1,8 µg shRNA und 3 µl Transfektionsreagenz für den Mini- bzw. 4 µg shRNA und 10 µl Transfektionsreagenz für den Maxi-Ansatz durch-

geführt. Der Überstand wurde 6 Stunden nach der Transfektion abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS (0) gewaschen und über Nacht inkubiert. Mock-Kontrollen wurden mit „non-silencing“-shRNA transfiziert und die Transfektionseffizienz in jedem Ansatz über das Vektor-kodierte „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Für die Expression der rekombinanten OPV-Proteine wurden 7×10^5 293-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und am nächsten Tag analog zum Maxi-Ansatz transfiziert. Als Mock-Kontrollen wurden der pTriEx-3-Vektor (Novagen Inc., Darmstadt, DE), ein Ansatz ohne DNA und der BSK⁺-Vektor (Qiagen GmbH, Hilden, DE) mitgeführt. Für die Proteinaufarbeitung (2.9, 2.10) wurden die Zellpellets 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion geerntet.

2.9 Infektion von transfizierten Zellen

Transfizierte Zellen wurden mit einer Transfektionseffizienz zwischen 40 und 50 % für die Infektion verwendet. Mit ShortCut siRNA-transfizierte Zellen (2.8.1) wurden 4 und 8 Stunden nach der Transfektion mit 10 MOI VACV-LE in 0,5 ml Medium und shRNA-transfizierte Zellen (2.8.2) mit 0,025 MOI Calpoxvirus in 250 µl bzw. 1 ml Medium in Abhängigkeit des Mini- bzw. Maxi-Ansatzes infiziert. Die Infektion im Maxi-Ansatz wurde zusätzlich mit VACV-LE durchgeführt. Für die Infektion wurde das Medium von den transfizierten Zellen entfernt, die Kultur eine Stunde mit dem Virus inkubiert, die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und mit 1 bzw. 3 ml Medium (Mini/Maxi-Ansatz) bis zur Probenahme 24 und 48 Stunden p. i. versetzt. Von ShortCut siRNA- sowie shRNA-transfizierten Zellen des Mini-Ansatzes wurde der Zellkulturüberstand für die Titration abgenommen und das Zellpellet für die RNA-Extraktion in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden, DE) lysiert. Von den Maxi-Ansätzen wurde der Überstand für die Virustitration abgenommen. Die Zellen wurden 2 x mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, mit 0,5 ml PBS versetzt und mit einem Spatel von der Oberfläche abgeschabt und aliquotiert (350 µl für die Proteinisolation (2.10); 50 µl für die Extraktion der Virus-DNA (2.12.2); 150 µl für die Präparation von RNA (2.12.1). Die Zellsuspensionen wurden 5 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das Pellet für die RNA-Extraktion wurde in 200 µl RLT-Puffer (Qiagen GmbH) aufgenommen.

Um zu ermitteln, ab welchem Zeitpunkt nach der Infektion die OPV-Proteine A27 und D7 in der Zelle nachweisbar sind, wurden unter transfektionsähnlichen Bedingungen 5×10^5 293-Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und diese, ohne Transfektion, nach 48 Stunden mit 0,025 MOI Calpoxvirus infiziert. Zu den Zeitpunkten t_0 , t_3 , t_6 , t_9 , t_{24} , und t_{48} wurden die Zellen für die Proteinisolation gewonnen (2.10).

2.10 Proteinisolation aus eukaryontischen Zellen

Das Zellpellet wurde in 50 μ l RIPA-Puffer mit 0,01 Volumenanteilen Proteinaseinhibitor-Cocktail Set III (Calbiochem, San Diego, US) und 25 U/ml Benzonase® (Novagen Inc., Darmstadt, DE) lysiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 30 Minuten bei 14000 g (Centrifuge 5417R) und 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei –20°C eingefroren.

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 1 % Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), 0,5 % Natrium-Deoxycholat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 0,1 % SDS (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE), 50 mM Tris (pH 8,0)

Tris Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE)

2.11 Herstellung von siRNA

Um die Genexpression von OPV in der Zellkultur zu inhibieren, wurden mit zwei verschiedenen Methoden siRNAs gegen ausgewählte OPV-Gene hergestellt.

2.11.1 ShortCut siRNA

Ein Teilbereich der OPV-Gene *D7R* und *A56R* wurde mit spezifischen Primern (Tab. 5) amplifiziert (2.14) und in der Gelelektrophorese 2.16) analysiert. Da die Primer an ihrem 5' Ende über die T7-Promotorsequenz verfügten, konnten die PCR-Produkte direkt zur dsRNA-Synthese in die *in vitro* Transkription eingesetzt werden. Die Transkription wurde nach den Herstellerangaben des RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6 and SP7 (Promega GmbH, Mannheim, DE) mit den T7-Reaktionskomponenten durchgeführt. Um DNA-freie dsRNA zu erhalten, wurde der Transkriptionsansatz mit 10 U RQ1-DNase (1 U/ μ l) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, mit dem RNA Cleanup Protokoll (Qiagen GmbH, Hilden, DE) gereinigt und die RNA mit 2 x 30 μ l DEPC-H₂O eluiert. In der Gelelektrophorese wurde überprüft, ob dsRNA vorliegt. Anhand des dsRNA Processing Protokolls aus dem ShortCut® RNAi Kit (New England Biolabs Inc., Ipswich, US) wurde

die dsRNA durch die RNase III zu ShortCut siRNA verdaut und mit einer Ethanol-Fällung (Protokoll 3, ShortCut® RNAi Kit) gereinigt. Die Fällung erfolgte für mindestens 4 Stunden bzw. über Nacht bei -70°C und wurde ohne RNase-freies Glykogen durchgeführt. Die siRNA wurde mit DEPC-H₂O eluiert. Die Größe der siRNA sowie der vollständige Verdau der dsRNA wurden in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (2.25.1) überprüft.

Tab. 5: Primersequenzen für die Synthese von ShortCut siRNA

Bezeichnung der Genregion (T _A)	Orientierung	Sequenz des Oligonukleotides 5'→3'
<i>A56R</i> (60°C)	Forward	<u>TAATACg</u> ACTCACTATAggggAgCCCAATTCCATTATTC
	Reverse	<u>TAATACg</u> ACTCACTATAgggTATTATgTCTATAgTCgATTCACTATCTg
<i>D7R</i> (60°C)	Forward	<u>TAATACg</u> ACTCACTATAggCgAgCTTTgTTACCAATggA
	Reverse	<u>TAATACg</u> ACTCACTATAggTCCAACACCAATAAACATTCATTC

T_A bezeichnet die Annealing-Temperatur in der PCR-Reaktion. Die T7-Promotorsequenz ist unterstrichen. Zur besseren Unterscheidung von dG und dC wurde dG klein geschrieben. Die Primer wurden von dem TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, DE) synthetisiert.

NaOAc, pH 5,5; Ethanol reinst, 99,8 %; DEPC, Diethylpyrocarbonat; Alle Reagenzien wurden von Merck KGaA (Darmstadt, DE) bezogen.

2.11.2 shRNA

Nach den Kriterien zum siRNA-Design von Saida Elbashir [90] sowie in Anpassung an die Erfordernisse des verwendeten psiSTRIKE™ hMGFP-Vektors wurden eine Vielzahl von siRNA-Sequenzen (Tab. 6) gegen die OPV-Gene *D7R*, *A56R*, *A27L*, *D8L* und *K4L* bestimmt und nach Anleitung des siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems (Human)-hMGFP (Promega GmbH, Mannheim, DE) shRNA-Expressionsvektoren hergestellt. Die Expressionsvektoren wurden in Bakterienkulturen (2.18.3) vermehrt, die Plasmide isoliert (2.19) und die siRNA-Sequenz mit den Sp6- und T7-Primern durch Sequenzierung (2.21) überprüft.

Tab. 6: Oligonukleotidsequenzen für die Herstellung von shRNA-Expressionsvektoren¹

Gen	Bezeichnung der shRNA	Sequenz des Oligonukleotides 5'→3'
Kontrolle ²	AB01	A01 ACC <u>Gaattctccgaacgtgtcagc</u> CTTCCTGTCAcgtgacacgttcggagaattcTTTTTc
		B01 ttaagaggcttcacagtgcGAAGGACAGTgcactgtgcaagcctcttaagAAAAAGACGT
D7R	AB02	A02 ACC <u>Gaaatggtaatgcgtatga</u> CTTCCTGTCAcctacgcattaccatttcTTTTTc
		B02 ttaccattacgcatactGAAGGACAGTtagtatgcgtaatggtaaagAAAAAGACGT
	AB03	A03 ACC <u>Gaacattaaacatcgaaga</u> CTTCCTGTCActtcgatgtttaatgttcTTTTTc
		B03 ttgtaattgttagcttctGAAGGACAGTagaagtacaaattacaagAAAAAGACGT
	AB04	A04 ACC <u>Ggtactgtatcatttagcg</u> CTTCCTGTCAcgtctaatgatacagtaccTTTTTc
		B04 catgacatagtaaactgcGAAGGACAGTgcgatttactatgtcatggAAAAAGACGT
A56R	AB05	A05 ACC <u>Ggagcccaattccattattct</u> CTTCCTGTCAagaataatggaattgggctccTTTTTc
		B05 ctcgggttaaggtataagaGAAGGACAGTtcttattaccttaacccgaggAAAAAGACGT
	AB06	A06 ACC <u>Gcttggtataaggagcccaat</u> CTTCCTGTCAattgggctcttataccaagcTTTTTc
		B06 gaaccatattcctcgggttaGAAGGACAGTtaacccgagggaatattgggtcgAAAAAGACGT
	AB07	A07 ACC <u>Gtctcacactacagtaagt</u> CTTCCTGTCAacttactgtagtgtatgagacTTTTTc
		B07 agagtatgtgatgtcattcaGAAGGACAGTtgaatgacatcacatactctgAAAAAGACGT
A27L	AB08	A08 ACC <u>Gaggctaaacgcgaagcaatt</u> CTTCCTGTCAaattgcttcgcgtttagcctcTTTTTc
		B08 tccgatttgcgcttcgttaaGAAGGACAGTtaacgaagcgcaaatcggagAAAAAGACGT
	AB09	A09 ACC <u>Gctgaaactctaagagcggt</u> CTTCCTGTCAagccgctcttagagtttcagcTTTTTc
		B09 gactttgagattctcgccgaGAAGGACAGTtcggcgagaatctcaaatcgAAAAAGACGT
	AB10	A10 ACC <u>Gttcagactggacggcgacca</u> CTTCCTGTCAtggtcgccgtccagtctgaacTTTTTc
		B10 aagtctgacctgccgctggtGAAGGACAGTaccagcggcaggtcagacttgAAAAAGACGT
D8L	AB11	A11 ACC <u>Ggatccaatcacttgatagat</u> CTTCCTGTCAatctatcaagtattgatccTTTTTc
		B11 ctagggttagtgaaactatctaGAAGGACAGTtagatagttcactaacctaggAAAAAGACGT
	AB12	A12 ACC <u>Gaggcaaaaaaacacgatgat</u> CTTCCTGTCAatcatcgtgttttttgccctcTTTTTc
		B12 tccgtttttgtgtactaGAAGGACAGTtagtagcacaaaaaacggagAAAAAGACGT
	AB13	A13 ACC <u>Gagtcgacgatatcgcgaga</u> CTTCCTGTCActctcgcaatctgcgcactcTTTTTc
		B13 tcagctgctataagcgtctctGAAGGACAGTtagagcgttatagcagctgagAAAAAGACGT
K4L	AB14	A14 ACC <u>Ggatgaagtgggtacgaattt</u> CTTCCTGTCAaaattcgtaccacttcatccTTTTT
		B14 ctacttcacccatgcttaaaGAAGGACAGTttaagcatgggtgaagtaggAAAAAGACGT
	AB15	A15 ACC <u>Gaggagttcttcatacaaaat</u> CTTCCTGTCAattttgtatgaagaactcctcTTTTTc
		B15 tcctcaagaagtatttttaGAAGGACAGTtaaacatacttcttgaggagAAAAAGACGT
	AB16	A16 ACC <u>Gctggcaacgatcttcgttta</u> CTTCCTGTCAataacgaagatcggtgccagcTTTTTc
		B16 gaccgttgctagaagcaaatGAAGGACAGTatttgctctagcaacggctcgAAAAAGACGT

¹ Die siRNA-Sequenzen sind unterstrichen und jeweils im A-Oligonukleotid lokalisiert. ACCG komplementiert die U6-Promotorsequenz, TTTT führt zum Abbruch der Transkription und CTCCTGTCA ist die Loop-Sequenz für den flexiblen RNA-Hairpin. Die Oligonukleotide wurden von Metabion International AG (Martinsried, DE) synthetisiert. ² Die Kontroll-siRNA kodiert für eine nonsense-Sequenz und dient als Transfektionskontrolle. Die Sequenz wurde von der Firma Qiagen (Hilden, DE) übernommen.

2.12 Isolierung von Nukleinsäuren

2.12.1 RNA-Extraktion

Die Präparation von RNA aus Zellpellets erfolgte nach dem „RNeasy Mini Protocol for the Isolation of Total RNA from Animal Cells“ (RNeasy® Mini Kit; Qiagen GmbH, Hilden, DE). Abweichend vom Protokoll wurden die Säulen mit 500 µl Puffer RW1 (Schritt 6) gewaschen und die RNA in 50 µL DEPC-H₂O eluiert.

RNA aus Virusstock wurde nach dem RNA Cleanup Protokoll (RNeasy® Mini Kit) aufgearbeitet. 200 µl Probe wurden in 700 µl RTL-Lysispuffer aufgenommen, mit 500 µl 100% igem Ethanol gewaschen und in 50 µL DEPC-H₂O eluiert.

2.12.2 DNA-Extraktion

DNA aus Zellpellets oder 200 µl Zellkulturüberstand bzw. Virusstock wurde mit dem „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, DE) extrahiert. Die Pellets wurden zuvor in 200 µl PBS aufgenommen. Die DNA wurde mit 50 µl (Zellpellets aus siRNA-Versuchen und Virusstocks), 250 µl (Zellkulturüberstände) und 350 µl (Zellpellets aus Infektionskinetiken) AE-Puffer eluiert. Alle Zellkulturüberstände wurden vor der Extraktion eine Stunde bei 65°C inaktiviert.

2.12.3 DNase-, RNase-Verdau

Kontaminierende DNA in RNA-Proben wurde mit dem „TURBO DNA-free™ Kit“ (Ambion Inc., Austin, US) nach Angaben des Herstellers entfernt. Das RNA/Enzym-Gemisch wurde insgesamt 30 Minuten bei 37°C inkubiert und nach 10 Minuten jeder Ansatz erneut mit 1 µl Enzym versetzt, um einen vollständigen DNase-Verdau zu gewährleisten.

Zur Entfernung von RNA aus Virusstocks wurden 200 µl Probe mit 10 µl RNase A/T1 Mix (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE) 30 Minuten bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend durch Zugabe von 4 µl RNasin (Promega GmbH, Mannheim, DE) inaktiviert.

2.13 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch eine Reverse Transkriptase-Reaktion in einem Volumen von 20 μ l hergestellt. Dazu wurden 5 μ l RNA, 1 μ l OligodT₍₁₈₎-Primer (500 ng/ μ l; Metabion International AG, Martinsried, DE), 1 μ l Kalbsthymus-DNA, Typ XV (500 ng/ μ l Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE) und 5,6 μ l DEPC-H₂O 5 Minuten bei 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen und auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe von 4 μ l 5 x First-Strand Puffer¹, 2 μ l 0,1 M DTT¹, 0,4 μ l 25 mM dNTP¹ und 1 μ l Superscript™ II RT (200 U/ μ l)¹ wurde das Gemisch 50 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Zur weiteren Verwendung wurde die cDNA im Verhältnis 1:5 und 1:50 bei den Infektionskinetiken verdünnt.

Um in der real-time PCR Signale durch DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde für jeden cDNA-Ansatz ein Reaktionsansatz ohne Enzym mitgeführt. Kam es bei einer PCR in der Negativkontrolle zu einer Produktbildung, wurde die RNA erneut mit DNase verdaut.

¹Diese Reagenzien sind von Invitrogen, Karlsruhe, DE

2.14 Konventionelle PCR

Mit der PCR wurden aus Calpoxvirus-DNA spezifisch Genomfragmente für die Herstellung von Plasmidstandards, Expressionsplasmiden oder Templates für die ShortCut siRNA-Synthese amplifiziert (Tab. 7). Die verwendeten Primer für die Plasmidstandards sind in Tab. 9 und für die Expressionsplasmide bzw. Amplifikate der ShortCut siRNA in Tab. 12 bzw. Tab. 5 aufgeführt.

Das Insert der rekombinanten Plasmide wurde mit der Kolonie-PCR überprüft (Tab. 7). Dazu wurden Bakterienkolonien des ausplattierten Transformationsansatzes mit einem Zahnstocher gepickt, im PCR-Ansatz resuspendiert, amplifiziert und anschließend im Agarosegel analysiert. Die PCR wurde mit spezifischen oder den Vektor-Primern M13, T7 bzw. Sp6 (Tab. 11) durchgeführt.

Die PCR-Reaktion wurde 2 Minuten bei 94°C, 30 x (20 Sek. bei 94°C, 20 Sek. bei 55-63°C², 30 Sek. bei 72°C), mit einer finalen Elongationsphase für 10 Minuten bei 72°C durchgeführt.

² Die Annealingtemperatur richtet sich nach der errechneten Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaares und ist im Zusammenhang mit der jeweiligen Primersequenz aufgeführt.

Tab. 7: PCR-Ansatz (50 µl)

Reagenzien	Volumen
10 x PCR-Puffer, ohne Mg	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl
dNTP (2,5 mM)	4 µl
sens Primer (10 µM)	1,5 µl
antisense Primer (10 µM)	1,5 µl
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Template-DNA	1-10 µl
bidest.-H ₂ O	ad 50 µl

2.15 Quantitative real-time PCR

Die real-time PCR ist eine sensitive, auf der klassischen PCR basierende Modifikation, bei welcher die Zielsequenz noch während der Amplifikation im geschlossenen Reaktionsgefäß spezifisch detektiert und über die zugehörige Plasmidstandardreihe quantifiziert werden kann. Alle Reaktionsbedingungen der einzelnen real-time PCRs sind in Tab. 8 und Tab. 9 aufgeführt. Die Nachweissysteme für die OPV-Gene *K4L*, *D8L*, *A27L*, *C12L* und *E3L* wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Nitsche (Robert Koch-Institut, Berlin, DE) etabliert.

Die real-time PCR-Reaktion mit dem spezifischen Sondenformat erfolgte 10 Minuten bei 95°C, 45 x (15 Sek. bei 95°C und 30 Sek. bei 55-60°C¹) und für SYBR® Green 10 Minuten bei 95°C, 45 x (15 Sek. bei 95°C, 30 Sek. bei 55-58°C¹ und 10 Sek. bei 82 bzw. 84°C²). Alle real-time PCR-Analysen wurden entweder am 7700 Sequence Detector System oder am 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc, Foster City, US) durchgeführt.

¹ Die Annealingtemperatur richtet sich nach der errechneten Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaares und ist im Zusammenhang mit der jeweiligen Primersequenz in Tab. 9 aufgeführt. ² Bei diesem Schritt erfolgt die Messung des Fluoreszenzsignals. Die Temperatur beträgt 82°C für *E3L* und *C12L* sowie 84°C für *K4L*. Temperatur- und Zeitangaben beziehen sich hier nur auf das 7700 Sequence Detector System.

2.16 Gelelektrophorese zur Identifikation von PCR-Produkten

Die Analyse von PCR-Produkten erfolgte in der Gelelektrophorese. Entsprechend ihrer Größe wurde 1 bis 3 % Agarose in 1 x TAE aufgekocht und in eine Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid-

haltigem (0,8 µg/ml, Gibco BRL, Eggenstein, DE) 1 x TAE-Puffer versetzt, 5 µl des PCR-Produktes mit 2 µl 6 x-Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Für die Größenbestimmung der PCR-Fragmente wurde ein Molekulargewichtsmarker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen. Die Auftrennung der Produkte erfolgte 30 bis 90 Minuten bei 90-100 V und die Detektion durch die Fluoreszenzanregung des in den DNA-Doppelstrang interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht.

TAE-Puffer (50x): 242 g Tris-base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), 57,1 ml Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8, auffüllen auf 1 l mit bidest.-H₂O, autoklavieren

0,5 M EDTA, pH 8: 186,1 g EDTA (Merck KGaA), 800 ml bidest.-H₂O, 20 g NaOH (Merck KGaA), ad 1 l mit bidest.-H₂O, autoklavieren

peq Gold Universal Agarose (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE); Molekulargewichtsmarker verschiedener Größenbereiche (MBI Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot, DE)

Tab. 8: Real-time PCR-Ansatz (25 µl)

Reagenzien	Volumen	
	spezifisches Format, TaqMan	unspezifisches Format, SYBR® Green ¹
10 x PCR-Puffer, ohne Mg	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl	2 µl
dNUTP (2,5 mM)	2 µl	2 µl
sense Primer (10 µM)	0,75 µl; 0,4 µl ²	0,4 µl
antisense Primer (10 µM)	0,75 µl; 0,4 µl ²	0,4 µl
Sonde (10 µM)	0,25 µl; 0,2 µl ²	—
SYBR® Green (1:1000)	—	1,2 µl
Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	0,1 µl
Template-DNA	5 µl (DNA) bzw. 10µl (cDNA)	5 µl (DNA) bzw. 10µl (cDNA)
bidest.-H ₂ O	ad 25 µl	ad 25 µl

¹ Die real-time PCR-Assays *K4L*, *E3L* und *C12L* wurden mit SYBR® Green durchgeführt. ² Primer- und Sondenvolumina für den *A27L*-Assay

Tab. 9: Primer und Sonden für die real-time PCR

Bezeichnung der Genregion (T _A)	Primer und Sonden	Sequenz des Oligonukleotides 5'→ 3'
<i>A27L</i> (60°C)	Forward	CYgAAACTCTRAgAgCggCTATgA
	Reverse	CgBCgWCCAgTCTgWACATCAA
	Sonde	F-ATCTCTggCTAAAAAg-MGB
<i>A56R</i> (60°C)	Forward	ggAgCCCAATTCCATTATTC

<i>A53R</i> (60°C)	Reverse	gTATTATgTCTATAgTCgATTCACTATCTg
	Sonde	F-TC(T)CCA(T)ACgA(T)gATC(T)AgTXTACAACT-p
	Forward	CATTggTTACAgCgATATACCTACT
<i>B16R</i> (60°C)	Reverse	ggTACACTTTACCTTATCAAATgATCC
	Sonde	F-CTTggCAAATTCTCCAggTggACACXT-p
	Forward	AAATAATACCTTCTACTATgCAATTACCAg
<i>B28R</i> (60°C)	Reverse	TAAACgTTgTAgCATCTTCTTCCTT
	Sonde	F-TATCgTTgAgACCTCCCACA-MGB
	Forward	CCAYCCAATggAAAgTgTAAAgACA
<i>C12L</i> (58°C) ¹	Reverse	AgATTCTATTgTgAgTCgTgTTACACg
	Sonde	F-TCACATAATCTggAAgCgTATgTTCCCgTXT-p
	Forward	CATATCCTTTgCCAACCAATACAT
<i>c-myc</i> (60°C)	Reverse	CTTTCATgTATgggTgTgTTCAC
	Forward	gCCAgAggAggAACgAgCT
	Sonde	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA
<i>crmD</i> (60°C)	Reverse	F-TgCCCTgCgTgACCAgATCCXT-p
	Forward	ATTggAgATTACTATTCAgTCgTTgAT
	Sonde	gAATgAggCATAAAgTATACCTTCg
<i>D6R</i> (60°C)	Reverse	F-TCTAgACAACCTAACACCCAC-MGB
	Forward	ACCAACTATATTACCTCATCAgTTAgC
	Sonde	TTAAACAAgTTCATAgCTACACCCA
<i>D7R</i> (60°C)	Reverse	F-ACAAAgCgATTATTgTTTTACCTgATCCCAXTA-p
	Forward	TTATCATACgCATTACCATTTCgA
	Sonde	CTgTAgTTATAAACgTTCCgTgTg
<i>D8L</i> (55°C)	Reverse	F-ATCgCTAAATgATACAgTTACCCgAAXTCTCTACT-p
	Forward	ggATgTTCTATATACggggATgAgTAg
	Sonde	AAAgTTAATAAggTAgATgACACgTTCT
<i>E3L</i> (55°C) ¹	Reverse	F-TTCTCATCATCAgAATAAA-MGB
	Forward	ATCAgtgggRCCTAgTAACTCTCCT
	Sonde	TgATgACgTAACCAAgAAgTTTATCTAC
<i>G8R</i> (60°C)	Reverse	AggAACTgATgCCTATTAggACAgATA
	Forward	TgATAAAgCCCAACAACCATTTCTA
	Sonde	F-ATgACggTTCTACCACAAC-MGB
<i>K4L</i> (58°C) ¹	Forward	CYTTgTgTAgATTTgATACggCTATTCT
	Reverse	ACAACggTAgAATTggACACTCTg

¹ Diese PCR-Systeme werden mit SYBR® Green durchgeführt. T_A=Annealing-Temperatur; F=6'-Carboxy-Fluorescein (6-Fam); X=Tetramethyl-Rhodamin (Tamra), gebunden an Thymidin; p=Phosphat, blockiert das 3'-Ende; MGB= Minor Groove Binder; Y=C/T ; R=A/G ; B=C/G/T ; W=A/T ; Zur besseren Unterscheidung von dG und dC wurde dG klein geschrieben. Primer (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, DE bzw. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE); TaqMan Hydrolysis-Sonden (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH), MGB-TaqMan-Sonden (Applied Biosystems Inc, Foster City, US); SYBR® Green (Invitrogen GmbH)

2.17 Aufreinigung von DNA

2.17.1 Aufreinigung von DNA aus PCR-Reaktionsansätzen

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, DE) aufgereinigt und die DNA mit 50 µl bidest.-H₂O eluiert.

2.17.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen ermöglicht die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente. Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, nach den Anweisungen des „Jetquick Gel Extraction Spin Kits“ (Genomed, Löhne, DE) aufgearbeitet und die DNA mit 50 µl bidest.-H₂O eluiert.

2.18 Klonierung

2.18.1 Präparation kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli* XL1- Blue MRF' Kan Supercompetent Zellen (Stratagene, La Jolla, US) wurden mit dem „Z-Competent *E. coli* Transformation Kit“ (Zymo Research, US) hergestellt. Die Qualität der Z-kompetenten Zellen wurde über die Transformationseffizienz ermittelt. 100 µl kompetente Zellen wurden mit 1 ng des Kontrollplasmids pEMBL (Dr. H. Ellerbrok, Robert Koch-Institut, Berlin, DE) transformiert und 10 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt und die Anzahl transformierter Zellen pro 1 µg Plasmid-DNA bestimmt. Nur Zellen mit einer Transformationseffizienz von $>10^7$ pro 1 µg DNA wurden weiter verwendet.

2.18.2 TOPO TA Klonierung

Um Plasmidstandards für die real-time PCR herzustellen, wurde die Zielsequenz nach Herstellerangaben in den pCR2.1-Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) kloniert. Es wurden 1 bis 4 µl PCR-Produkt in die Ligation eingesetzt. 50 µl Z-kompetente Zellen wurden mit dem Ligationsansatz vermischt, 15 Minuten auf Eis inkubiert, auf LB-Amp⁺⁺-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Transformationskontrolle diente 1 ng des Plasmids pEMBL.

Positive Klone wurden mit der „Blau-Weiß-Selektion“ identifiziert. Die weißen Kolonien wurden gepickt und in der Kolonie-PCR (2.14) analysiert.

Luria-Bertani (LB)-Amp⁺⁺-Agar: 10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL, Eggenstein, DE), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL), 10 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 15 g Agar (Gibco BRL), 100 µg/ml Ampicillin (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE), ad 1 l bidest.-H₂O, pH 7, autoklavieren, ad 40 µg/ml X-Gal, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid (BTS-Biotech Trade Service GmbH, Sankt Leon-Rot, DE), 0,5 mM IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (BTS-Biotech Trade Service GmbH)

2.18.3 Präparation von rekombinanten Bakterienkulturen

Eine Bakterienkolonie mit gewünschtem Insert wurde in eine 3 ml-LB-Amp-Flüssigkultur überführt und auf einem Schüttler 12 – 15 Stunden bei 37°C und 180 rpm kultiviert.

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine 100 ml-Flüssigkultur im Verhältnis 1:500 mit Bakterien aus einer 3 ml-Flüssigkultur angeimpft. Die 3 ml-Kultur wurde 8 Stunden bei 37°C und 180 rpm geschüttelt und die 100 ml Kultur wurde 12 – 15 Stunden unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium: 10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL, Eggenstein, DE), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL), 10 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE), ad 1 l bidest.-H₂O, pH 7, autoklavieren, ad 100 µg/ml Ampicillin (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) unmittelbar vor Benutzung

2.18.4 Berechnung der Kopienzahl

Von allen Plasmidstandards wurde die Kopienzahl über die nachstehende Formel ermittelt.

$$\text{Größe des Plasmids [bp]} = \text{Größe des Vektors [bp]} + \text{Größe des Inserts [bp]}$$

$$\text{Molekulargewicht (MW) für dsDNA} = 660 \text{ g mol}^{-1} \text{ bp}^{-1}$$

$$\text{AVOGADRO-Zahl} = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

$$\text{Konzentration an Plasmidkopien [mol/µl]} = \text{Plasmidkonzentration [g/µl]} / (\text{Größe des Vektors [bp]} \times 660 \text{ [g mol}^{-1} \text{ bp}^{-1}])$$

$$\text{Konzentration an Plasmidkopien [mol/µl]} \times 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} = \text{Plasmidkopien [µl}^{-1}]$$

2.19 Plasmid-Präparation

Mit Hilfe des „NucleoSpin Plasmid Kits“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE) wurde Plasmid-DNA aus 1,5 ml einer 3 ml-LB-Flüssigkultur (2.18.3) isoliert und mit 50 µl bidest.-H₂O eluiert.

Die Aufarbeitung von Plasmiden aus einer 100 ml-Flüssigkultur (2.18.3) erfolgte mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, DE) nach Anleitung des Herstellers. Um Rückstände von Salzen zu entfernen, wurden die DNA-Pellets zweimal mit 70 % igem Ethanol gewaschen. Alle DNA-Pellets wurden in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Ethanol reinst, 99,8 % und 2-Propanol (Merck KGaA, Darmstadt, DE)

2.20 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

DNA und dsRNA wurden in einem Spektralphotometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, US) bei einer Wellenlänge von 260 nm (1OD = 50 µg/ml) gemessen.

Die Konzentration des D7-Proteins wurde über eine Extinktionsmessung bei 280 nm mit dem Spectrophotometer ND-1000 (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) ermittelt. Dazu wurde mit Hilfe des „Proteomics and sequence analysis tools“ unter der Web-Adresse www.expasy.ch der Extinktionskoeffizient sowie das Molekulargewicht berechnet.

2.21 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mit der Kettenabbruchreaktion nach Sanger [99] durchgeführt, wofür das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc, Foster City, US) verwendet wurde. Zur Analyse beider DNA-Stränge wurde jede Sequenzierung mit dem sense und antisense Primer in einem separaten Ansatz (Tab. 10) durchgeführt. Spezifische Primer wurden für die Sequenzierung von PCR-Produkten verwendet (Tab. 9). Plasmidstandards wurden mit T7 und M13, shRNA-Plasmide mit T7 und Sp6 und die Plasmide zur rekombinanten Proteinexpression sowohl mit spezifischen Primern (Tab. 12) als auch mit den HA-Seq-F und TriExDown-mod Primern sequenziert (Tab. 11). Die Sequenzreaktion erfolgte 2 Minuten bei 94°C, 25 x (10 Sek. bei 96°C, 5 Sek. bei 55-63°C und 4 Minuten bei 60°C), wobei sich die Annealingtemperatur nach der Schmelztemperatur des jeweiligen Primers richtet.

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden im Kapillarsequencer ABI-PRISM Sequenzer 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc) aufgetrennt und die Fluoreszenzsignale mit der „Sequence Analysis Software“ (Applied Biosystems Inc) ausgewertet. Die Analyse und Bearbeitung der Sequenzen erfolgte mit der SeqMan Software (DNASTAR Lasergene software 7.2.1). Für die Auswertung der Sequenzen wurde das „Basic Local Alignment Search Tool

BLAST“ der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) verwendet.

Tab. 10: Sequenzierungsansatz (10 µl)

Reagenzien	Volumen
DNA ¹	1-4 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
5 x Puffer	1,5 µl
Big Dye 3.1 Premix	1 µl
bidest.-H ₂ O	ad 10 µl

¹ Die einzusetzende DNA-Menge ist abhängig von der Größe des PCR-Produktes. Für Produkte mit einer Größe von 100 – 200 bp wurden 1-3 ng, für 200 – 500 bp bzw. 500 – 1000 bp große Produkte wurden 3-10 ng und 10-20 ng DNA eingesetzt. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden 150-300 ng DNA verwendet.

Tab. 11: Primersequenzen für die Sequenzierungsreaktion

Name des Oligonukleotides (T _A)	Orientierung	Sequenz des Oligonukleotides 5'→ 3'
T7 (55°C)	Forward	gTAATACgACTCACTATAgggCg
M13 (55°C)	Reverse	CaggAAACAgCTATgAC
Sp6 (53°C)	Reverse	gATTTAggTgACACTATAg
HA-Seq-F (63°C)	Forward	ggATCTACACATTCACCggAAACCA
TriExDown-mod (55°C)	Reverse	TCgATCTCagTggTATTTgTgAgCCAg

T_A bezeichnet die Annealing-Temperatur in der PCR-Reaktion. Zur besseren Unterscheidung von dG und dC wurde dG klein geschrieben. Die Primer wurden von dem TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, DE) synthetisiert.

2.22 Herstellung rekombinanter Expressionsplasmide

Die OPV-Gene *D7R*, *A27L*, *A56R* und *D8L* wurden in der PCR (2.14) mit spezifisch modifizierten Primern (Tab. 12) amplifiziert. Aufgrund des Primerdesign wurden Restriktionsschnittstellen in die PCR-Fragmente eingeführt, die eine Insertion der Fragmente in den pTriEx-3-Vektor ermöglichen. Der reverse Primer wurde so gewählt, dass das Stopcodon des Zielgens zerstört und der Leserahmen auf dem Vektor erhalten bleibt. Dadurch wird der vom Vektor kodierte Polyhistidin-Tag an das exprimierte Protein angefügt.

Die Amplifikate wurden mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) aufgereinigt und dann sowohl die PCR-Produkte als auch der pTriEx-3-Vektor (Novagen Inc., Darmstadt, DE) mit den Restriktionsenzymen NcoI und PstI über Nacht bei 37°C sowie für weitere 2 Stunden über Tag nach der Zugabe von frischem Enzym verdaut

(Tab. 13). Der Restriktionsansatz des PCR-Produkts wurde mit dem QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt. Der Verdau des Vektors wurde in der Gelelektrophorese überprüft (2.16), das entsprechende DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (2.17.2). Um eine Selbstligation des pTriEx-3-Vektors bei der Ligation zu verhindern, wurde dieser nach dem Protokoll in Tab. 14 dephosphoryliert. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 37°C.

Tab. 12: Primersequenzen für die Amplifikation von OPV-Genen

Bezeichnung der Genregion (T _A)	Bezeichnung des Oligonukleotides	Sequenz des Oligonukleotides 5'→3'
<i>D7R</i> (63°C)	RPO18- <u>NcoI</u> -F	AgAAATCCATggCgAgCTTTgTTACCAATg
	RPO18- <u>PstI</u> -R	TTCTCTCTgCAgTgAgTCgACgATATTCgC
<i>A27L</i> (63°C)	14K- <u>NcoI</u> -F	CTgTACTTTCCATggACggAACTCTTTTCC
	14K- <u>PstI</u> -R	TTgAgTCTgCAgATATggTCgCCgTCCAgt
<i>A56R</i> (63°C)	HA- <u>NcoI</u> -F	TACACTACCATggCACgATTgCCAgtTACTT
	HA- <u>PstI</u> -R	gTCAACTgCAggACTTTgTTTTCTgTTTTg
<i>D8L</i> (63°C)	D8L- <u>NcoI</u> -F	AgCTTACCATggCgCAACAATATCTCCTA
	D8L- <u>PstI</u> -R2	CAAACgCTgCAgCgTATTggCggATCTA

T_A bezeichnet die Annealing-Temperatur in der PCR-Reaktion. Zur besseren Unterscheidung von dG und dC wurde dG klein geschrieben. Die Schnittstellen für NcoI und PstI sind unterstrichen. Die Primer wurden von dem TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, DE) synthetisiert.

Tab. 13: Restriktionsansatz

Reagenzien	aufgereinigtes PCR-Produkt	pTriEx-3
DNA	48 µl	1 µl (3 µg/µl)
NcoI (10 U/µl)	5 µl	5 µl
PstI (10 U/µl)	10 µl	10 µl
10 x Y ⁺ /Tango-Puffer	10 µl	5 µl
bidest.-H ₂ O	27 µl	29 µl
Inkubation bei 37°C, über Nacht		
NcoI (10 U/µl)	5 µl	5 µl
PstI (10 U/µl)	10 µl	10 µl
Inkubation bei 37°C, 2 Stunden		

NcoI, PstI und 10 x Y⁺/Tango-Puffer (MBI Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot, DE)

Tab. 14: Dephosphorylierung des verdauten Vektors

Reagenzien	Volumen
verdauter Vektor	57,5 µl
10 x CIP-Puffer	10 µl
Alkalische Phosphatase (1000 U/µl)	5 µl
bidest.-H ₂ O	27,5 µl

10 x CIP-Puffer und Alkalische Phosphatase (Promega GmbH, Mannheim, DE)

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit dem dephosphorylierten pTriEx-3-Vektor im Verhältnis 5 zu 1 gemischt und über Nacht bei 16°C ligiert (Tab. 15). 15 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl Z-kompetenten Zellen (2.18.1) 20 Minuten auf Eis inkubiert, der Transformationsansatz auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Klone wurden gepickt und die Inserts mit der Kolonie-PCR (2.14) analysiert. Inserts mit der erwarteten Fragmentgröße wurden sequenziert (2.21). Nur von Klonen, die auf Aminosäure-Ebene die korrekte Gen-Sequenz aufwiesen, wurde eine Maxi-Plasmid-Präparation (2.19) durchgeführt. Die Plasmide wurden für die rekombinante Proteinexpression in eukaryontischen Zellen (2.8.2) und in *E. coli* Rosetta™ (DE3) (2.23.2) verwendet.

Tab. 15: Ligationsansatz

Reagenzien	Volumen
PCR-Fragment	5 Teile
Vektor	1 Teil
T4-Ligase (10 U/µl)	1 µl
10 x Ligase-Puffer	2 µl
bidest.-H ₂ O	ad 20 µl

T4-Ligase und 10 x Ligase-Puffer (Promega GmbH, Mannheim, DE)

Luria-Bertani (LB)-Amp-Agar: 10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL, Eggenstein, DE), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL), 10 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 15 g Agar (Gibco BRL), 100 µg/ml Ampicillin (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE), ad 1 l bidest.-H₂O, pH 7, autoklavieren

2.23 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli* Rosetta™ (DE3)

2.23.1 Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine 5 mL LB*-Flüssigkultur wurde mit einer Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes Rosetta™ (DE3) (Novagen Inc., Darmstadt, DE) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 250 ml LB*-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit Bakterien aus der 5 ml-Flüssigkultur angeimpft und bis zu einer OD_{λ600} von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde bei 4°C und 4000 rpm pelletiert, das Pellet in 40 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Pelletierte Zellen wurden in TFB II-Puffer resuspendiert und Aliquots à 80 µl bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz wurde wie unter 2.18.1 beschrieben mit dem pUC19-Plasmid (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) ermittelt.

TFB I-Puffer: 30 mM CH₃COOK (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE), 50 mM MgCl₂ (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 100 mM RbCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), 10 mM CaCl₂ (Carl Roth GmbH), 15 % Glycerin (Carl Roth GmbH), pH 5,8 mit Essigsäure (Carl Roth GmbH), steril filtrieren

TFB II-Puffer: 10 mM MOPS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 75 mM CaCl₂ (Carl Roth GmbH), 10 mM RbCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 15 % Glycerin (Carl Roth GmbH), pH 7,0 mit KOH (Carl Roth GmbH), steril filtrieren

Luria-Bertani (LB)*-Medium: 10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL, Eggenstein, DE), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL), 10 g NaCl (Merck KGaA), ad 1 l bidest.-H₂O, pH 7, autoklavieren, ad 35 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) unmittelbar vor Benutzung

2.23.2 Rekombinante Proteinexpression

80 µl kompetente *E. coli*-Zellen (2.23.1) wurden mit 10 ng des rekombinanten D7-Plasmids (2.22) vermischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert, für 30 Sek. bei 42°C im Heizblock „Hitze-geschockt“ und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) und 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz in 15 ml LB**-Medium aufgenommen und ca. 16 Stunden bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 2 x 200 ml LB**-Medium wurden im Verhältnis 1:50 aus der 15 ml-Bakterienkultur angeimpft und diese bis zu einer OD_{λ600} von 0,5 kultiviert. Durch die Zugabe von 2 mM IPTG (BTS-Biotech Trade Service GmbH, Sankt Leon-Rot, DE) wurde die Proteinexpression induziert. Jeweils vor der Induktion und 3 Stunden nach der Induktion wurde 1 ml Probe entnommen, diese 3 Minuten bei 13000 g (Centrifuge 5417R) zentrifugiert und das Pellet eingefroren. Anhand dieser Pellets wurde im Western Blot (2.25) überprüft, ob die Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle induziert wurde und die Proteine gelöst oder in „inclusion bodies“ vorliegen (2.23). Die Bakterienkulturen wurden 3

Stunden nach der Induktion bei 4000 rpm zentrifugiert und die Pellets bis zur Proteinisolierung (2.23.3) bei -20°C eingefroren.

Luria-Bertani (LB)**-Medium: 10 g Bacto-Trypton (Gibco BRL, Eggenstein, DE), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL), 10 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE), ad 1 l bidest.-H₂O, pH 7, autoklavieren, ad 35 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE) und 100 µg/ml Ampicillin (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) unmittelbar vor Benutzung

2.23.3 Präparation und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Wenn Proteine in *E. coli* rekombinant exprimiert werden, so verbleiben diese idealerweise im Zytoplasma. Sehr stark exprimierte Proteine können sich in unlöslichen Aggregaten, den „inclusion bodies“, ansammeln. Um zu überprüfen, ob das rekombinante D7-Protein als gelöstes oder aggregiertes Protein vorliegt, wurden die Pellets in 50 µl PBS (0) mit 1 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE) und 1 µl TURBO DNase (2 U/µl, Ambion Inc., US) resuspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, resuspendiert und 5 Minuten bei 13000 g (Centrifuge 5417R) zentrifugiert. Anschließend wurde sowohl der Überstand als auch das Pellet im Western Blot (2.25) im Vergleich zu der nicht induzierten rekombinanten Bakterienkultur analysiert.

Da D7 als unlösliches Protein exprimiert wurde (Pellet-Fraktion), wurde es unter denaturierenden Bedingungen über eine Protino®Ni-IDA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, DE) aufgereinigt. Die Protino®Ni-IDA ist ein Silica-basiertes Harz mit geladenen Ni²⁺-Ionen, die mit den Histidiningruppen des C-terminal lokalisierten Polyhistidin-Tags des D7-Proteins interagieren. Die Pellets aus den 200 ml-Ansätzen (2.23.2) wurden in 30 ml Puffer A aufgenommen, vereinigt und über Nacht bei 4°C und 180 rpm geschüttelt. Aufgrund des in Puffer A enthaltenen Guanidinhydrochlorids wurden sowohl die Bakterienzellen als auch die „inclusion bodies“ lysiert und die Proteine freigesetzt. Die Suspension wurde 45 Minuten bei 4°C und 9900 g (Avanti J-E Centrifuge, Rotor JA25.50, Beckman Coulter Inc, Fullerton, US) zentrifugiert. Eine Säule (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) wurde mit 1 g Protino®Ni-IDA gefüllt, das Säulenmaterial mit bidest.-H₂O gewaschen und mit 15 ml Puffer A equilibriert. Die proteinhaltigen Überstände aus der Zentrifugation wurden auf die Säule gegeben, an welche die Proteine im basischen Milieu (pH 8) binden. Die Säule wurde mit Puffer A gewaschen und alle Proteine ohne Polyhistidin-Tag von der Säule entfernt. Mit Puffer B wurde von Guanidinhydrochlorid auf Harnstoff umgepuffert, damit die Proteine im Elutionsschritt besser von der Säule eluiert

werden können. Die Säule wurde mit Puffer C gewaschen und die D7-Proteine mit Puffer D bei pH 4,5 eluiert. Die gesamte Aufreinigung wurde bei 4°C in dem UV-Durchflußphotometer „Single Path Monitor UV-1“ (Pharmacia, Uppsala, SE) durchgeführt.

Das Eluat wurde in einen Dialyseschlauch überführt und 3 x mit je 2 Liter Dialysepuffer (2h, über Nacht, 2h) bei 4°C dialysiert, um den Harnstoff zu entfernen und die Proteine langsam zu renaturieren.

10 x NaPi-Stammlösung: 69 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 6,06 g Tris-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), ad 500 ml bidest.- H_2O

Puffer A: 15 ml 10 x NaPi-Stammlösung, 85,98 g $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$, Guanidinhydrochlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE), ad 150 ml bidest.- H_2O , pH 8,0 mit NaOH (Carl Roth GmbH)

Puffer B: 5 ml 10 x NaPi-Stammlösung, 24,02 g Harnstoff (Carl Roth GmbH), ad 50 ml bidest.- H_2O , pH 8,0 mit NaOH; Harnstoff bei 50°C im Wasserbad Lösen

Puffer C: 5 ml 10 x NaPi-Stammlösung, 24,02 g Harnstoff, ad 50 ml bidest.- H_2O , pH 6,3 mit HCl (Merck KGaA) oder NaOH; Harnstoff bei 50°C im Wasserbad Lösen

Puffer D: 5 ml 10 x NaPi-Stammlösung, 24,02 g Harnstoff, ad 50 ml bidest.- H_2O , pH 4,5 mit HCl; Harnstoff bei 50°C im Wasserbad Lösen

Dialyse-Schlauch: Visking Dialysis Tubing, MWCO 12000-14000 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE)

Dialysepuffer: 100 mM NaCl, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 50 mM Glycin, 2 % Glukose, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES; alle Chemikalien stammten von Merck KGaA (Darmstadt, DE)

2.24 Immunisierung von Hühnern

Für die Gewinnung von Anti-D7-IgY-Antikörpern wurde einem Huhn eine Emulsion aus 200 µl (0,5 µg/µl) des dialysierten D7-Proteins + 100 µl PBS + 300 µl FCA beidseitig (Hälfte/Hälfte) in den Musculus pectoralis injiziert und das Huhn zweimal mit 200 µl (0,5 µg/µl) D7 + 100 µl PBS + 300 µl FIA im Abstand von 4 Wochen geboostert. Die Immunisierung sowie die Aufreinigung der Antikörper [100] wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. Schade (Charité, Berlin, DE) durchgeführt.

FCA, Freund's Adjuvant, Complete und FIA, Freund's Adjuvant, Incomplete (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE)

2.25 Western Blot

Rekombinante und native OPV-Proteine wurde über eine SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Proteinexpression im Immunoblot detektiert.

2.25.1 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese

Proteine zwischen 12 und 43 kDa wie A27 (14 kDa/17,5 kDa), D7 (18 kDa/23 kDa) oder D8L (32 kDa/23 kDa, verkürzt) wurden in einem 15 % igem PAA-Gel und größere Proteine wie A56 (86 kDa/90 kDa) in einem 8 % igem Gel aufgetrennt (Tab. 16). Das Molekulargewicht für das native sowie für das rekombinante Protein mit Polyhistidin-Tag wurde in Klammern angegeben. β -Actin (42 kDa) wurde als Ladekontrolle immer in dem spezifischen Gel für das zu analysierende Protein mit aufgetragen.

6 μ l Probe wurden mit 2 μ l 5x Ladepuffer, 0,5 μ l 20x Reducing Agent und 1,5 μ l bidest.-H₂O vermischt, 10 Minuten bei 70°C erhitzt und auf das SDS-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 30 V und im Trenngel bei 60 V in 1x Tris-Glycin-Puffer.

Tab. 16: Zusammensetzung der PAA-Gele

Reagenzien	Trenngel (5 ml)		Sammelgel (3 ml)
	8 %	15 %	5 %
bidest.-H ₂ O	2,3 ml	1,1 ml	2,1 ml
30 % Acrylamidmix ¹	1,3 ml	2,5 ml	0,5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	-	0,38 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,03 ml
10 % APS	0,05 ml	0,05 ml	0,03 ml
TEMED	0,003 ml	0,002 ml	0,003 ml

¹ mit 0.8% Bisacrylamid

Der RNase III-Verdau der ShortCut siRNA (2.11.1) wurde in einem nicht-denaturierenden 20% PAA-Gel analysiert. 4 μ l Probe wurden mit 4 μ l 5x Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50 V in 1 x TBE-Puffer.

30 % Acrylamid Mix mit 0,8 % Bisacrylamid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE), SDS, Sodium Dodecyl Sulfate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), APS, Ammoniumpersulfat (Gibco BRL, Eggenstein, DE), TEMED, Tetramethylethyldiamin (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 5x Ladepuffer (MBI Fermentas GmbH, Sankt Leon-Roth, DE), 20 x Reducing Agent (MBI Fermentas GmbH), Protein-Marker, SM0671 (MBI Fermentas GmbH), 21 bp siRNA-Marker (New England Biolabs Inc., Ipswich, US)

1,5 M Tris: 9,08 g Tris-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), ad 50 ml mit bidest.-H₂O, pH 8,8 mit HCl (Merck KGaA)

1 M Tris: 6,06 g Tris-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), ad 50 ml mit bidest.-H₂O, pH 6,8 mit HCl (Merck KGaA)

5 x Tris-Glycin-Puffer: 15,1 g Tris-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 94 g Glycin (Merck KGaA), 50 ml 10% SDS, Sodium Dodecyl Sulfate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), ad 1 l mit bidest.-H₂O

5 x TBE-Puffer: 54 g Tris-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 27,5 g Bosäure (Merck KGaA), 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, ad 1 l mit bidest.-H₂O

20 % PAA-Gel: 6,6 ml 30 % Acrylamid Mix mit 0,8 % Bisacrylamid, 1,2 ml bidest.-H₂O, 2 ml 5 x TBE, 70 µl 10 % APS, 3,5 µl TEMED

2.25.2 Blotten

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Blot-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Whatman-Papier und die Nitrozellulosemembran wurden 5 Minuten in Transferpuffer equilibriert und von der Kathode zur Anode 3 Lagen Whatman-Papier, das SDS-Gel, die Nitrozellulosemembran und 3 Lagen Whatman-Papier übereinander gestapelt. Der Transfer erfolgte 2 Stunden bei 200 mA für ein Gel bzw. bei 300 mA für zwei Gele.

Whatman-Papier GB003 und Nitrocellulose Transfer Membran Protean BA83 von Schleicher & Schuell Bioscience GmbH (Dassel, DE)

Transferpuffer: 1,51 g Tris-Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE), 5,63 g Glycin (Merck KGaA, Darmstadt, DE), 50 ml Methanol (Merck KGaA), ad 500 ml mit bidest.-H₂O

2.25.3 Immunodetektion

Die Detektion der in eukaryontischen Zellen rekombinant exprimierten OPV-Proteine (2.8.2) erfolgte über den Polyhistidin-Tag in Anlehnung an das Western Blot Protokoll für die kolorimetrische Detektion der Firma Novagen Inc. (Darmstadt, DE; User Protocol TB283 Rev. B 1004). Zum Blocken als auch für die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper (Tab. 17) wurde eine 1 % ige Alkali-Soluble Casein-Lösung verwendet. Im Anschluss an die finalen Waschschrte wurde die Membran mit Zellstoff getrocknet und diese 1 bis 15 Minuten mit 8 ml Substrat (BCIP/NBT) inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Substrat abgenommen, die Membran dreimal mit bidest.-H₂O gewaschen und zwischen zwei Zellstofflagen getrocknet.

Zur Detektion der rekombinanten (2.23.2) bzw. nativen (2.9) D7- und A27- Proteine sowie für die Detektion von β -Actin mit spezifischen Antikörpern wurde ein weiteres Western Blot-Protokoll verwendet. Die Nitrozellulosemembran wurde 3 x 5 Minuten mit 15 ml Waschpuffer gewaschen, der Primärantikörper (Tab. 17) in 10 ml Verdünnungspuffer aufgenommen und die Membran damit für 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung

überschüssiger Antikörper wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper (Tab. 17) wurde in 10 ml Verdünnungspuffer verdünnt und die Membran 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran 6 x 5 Minuten mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Der immunologische Nachweis erfolgte wie oben beschrieben.

Tab. 17: Antikörper für den immunologischen Nachweis im Western Blot

Protein	Primärantikörper (Klon)	Sekundärantikörper
Polyhistidin-Tag	His•Tag Monoclonal Antibody (1:1000)	Goat-Anti-Mouse IgG APC (1:5000)
β-Actin	Monoclonal Anti-β-Actin (AC-74) (1:10000)	Goat-Anti-Mouse IgG APC (1:5000)
A27	Maus-anti-A27-Antikörper (5B4/2F2) (1:500)	Goat-Anti-Mouse IgG APC (1:5000)
D7	Anti-D7-IgY-Antikörper (1:200 bzw. 1:2000)	Donkey-Anti-chicken IgY (IgG) APC (1:5000)

Die finale Konzentration der Antikörper steht in Klammern. Alle Sekundärantikörper sind mit alkalischer Phosphatase (APC) konjugiert.

5 % Alkali-Soluble Casein (Novagen Inc., Darmstadt, DE), Substrat (BCIP/NBT) aus HIV-Blot 2.2 Western Blot Assay (Genelabs® Diagnostics SA, Genf, CH), His•Tag Monoclonal Antibody und Goat-Anti-Mouse IgG AP (Novagen Inc.), Monoclonal Anti-β-Actin (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, US), Donkey-Anti-chicken IgY (IgG) APC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, US)

Verdünnungspuffer: PBS*, 0,1 % Tween®20 (Fluka Chemikalien GmbH, Basel, CH), 1 % Milchpulver (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)

Waschpuffer: PBS*, 0,1 % Tween®20

PBS* (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, „mit Ca^{2+} und Mg^{2+} “): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ad 1 l mit bidest.- H_2O , pH 7,4; Alle Chemikalien wurden von Merck KGaA (Darmstadt, DE) verwendet.

2.26 Immunfluoreszenztest (IFT)

Im IFT wurde die Reaktivität und Spezifität der anti-OPV-Antikörper sowie die Infizierbarkeit humaner Zellen mit Calpoxvirus untersucht.

2.26.1 Herstellung der Präparate

In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 3×10^6 Hep-2-Zellen mit 0,5-0,8 MOI VACV-1354, VACV-LE, CPXV-81-02 und Calpoxvirus bzw. mit 1 MOI VACV-MVA-BN für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO_2 infiziert. Als Negativkontrolle wurden 1×10^6 nicht infizierte

Hep-2-Zellen ebenfalls für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 216 g (Varifuge 3.0R) zentrifugiert und die Pellets mit den infizierten Zellen in 10 ml bzw. die Pellets der nicht infizierten Kontrollzellen in 3 ml Medium aufgenommen. Auf jedem Objektträger wurden 30 µl der infizierten Zellsuspension auf 10 Kavitäten sowie 30 µl der nicht infizierten Zellsuspension auf 2 Kavitäten getropft und 20 bis 22 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Überstände in den Kavitäten wurden abgesaugt, die Objektträger für ca. 20 Minuten unter der Werkbank getrocknet und dann für 60 Minuten in Aceton fixiert. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Um die Infizierbarkeit der A-549-, Huh-7- und 293-Zellen zu untersuchen, wurden 1 x 10⁵ Zellen auf einem Deckgläschen in einer 24-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag für 1 Stunde mit 1 MOI Calpoxvirus inkubiert, zweimal mit Medium gewaschen und 24 Stunden bis zur Fixierung der Zellen in Aceton für 20 Minuten inkubiert.

Objektträger und Aceton wurden von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE) verwendet.

2.26.2 IFT

Die Anti-Pocken-Antikörper (Tab. 18) wurden in einer seriellen 1:2 (D7) bzw. 1:10 (A27) Verdünnung in PBS (0) mit 0,2 % Natriumazid (Merck KGaA, Darmstadt, DE) und 2 % BSA (Armour Pharmaceutical Company, Phoenix, US) verdünnt und je 20 µl pro Kavität aufgetragen. 20 µl der niedrigsten Antikörperversdünnung wurden als Negativkontrolle für die zu untersuchenden Antikörper in die Kavitäten der nicht infizierten Kontrollzellen gegeben. Als Positivkontrolle für den IFT wurden 20 µl eines polyklonalen Anti-Calpox-IgY-Antikörpers bzw. eines polyklonalen, humanen Serums gegen Pocken auf die infizierten Zellen gegeben. Der Objektträger wurde 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert, einmal in PBS gespült sowie 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Pro Kavität wurden 20 µl der verdünnten Sekundärantikörper aufgetragen, der Objektträger eine Stunde inkubiert, mit PBS gewaschen und eine Kernfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DAPI durchgeführt. Dazu wurden 20 µl einer 1:10 aufgetragen, das Präparat 10 Minuten im Brutschrank inkubiert und dann mit PBS gewaschen. Der Objektträger wurde getrocknet und mit DAKO Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, DK) eingedeckelt. Die

Präparate wurden dann mit dem Axiovert 200 (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, DE) und der Axiovision 3.1 Software (Carl Zeiss Jena GmbH) ausgewertet.

Die Infektion der humanen Zellen wurde mit dem polyklonalen, humanen Serum „Omrigam“ überprüft und je 70 µl Antikörper aufgetragen.

Tab. 18: Antikörper für den IFT

Zielpotein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
A27	Maus-anti-A27-Antikörper (5B4/2F2) (1:10 bis 1:10000)	Goat-Anti-Mouse IgG FITC (1:60)
D7	Anti-D7-IgY-Antikörper (1:10 bis 1:80)	Donkey-Anti-chicken IgY FITC (1:80)
Positivkontrolle, Pockeninfektion	Anti-Pocken IgG, Omrigam (1:500)	Goat-Anti-Human IgG FITC (1:50)
Positivkontrolle, IgY-Antikörper	Anti-Calpox-IgY-Antikörpermischung ¹ (1: 100)	Donkey-Anti-chicken IgY FITC (1:80)

¹ Aufgereinigtes IgY nach Immunisierung mit inaktiviertem Calpoxvirus. Diese Antikörpermischung wurde uns von Herrn Zhang (Charité und Robert Koch-Institut, Berlin, DE) zur Verfügung gestellt.

Die Endkonzentration der Antikörper im IFT steht in Klammern.

DAPI, 4',6- Diamidino-2-phenylindole·2HCl·H₂O (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE), Goat-Anti-Mouse IgG FITC (Dianova GmbH, Hamburg, DE), Donkey-Anti-chicken IgY FITC (Dianova GmbH), Goat-Anti-Human IgG FITC (Caltag Laboratories International GmbH, Hamburg, DE), Anti-Pocken IgG, Omrigam 5% G2H50CN HO4021, Israel, 2003

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Replikation von OPV *in vitro*

Für die Untersuchung der Replikation von OPV wurden Infektionsversuche durchgeführt, bei welchen (a) eine Zelllinie mit verschiedenen OPV infiziert und (b) verschiedene Zelllinien mit dem gleichen Virus infiziert wurden. Dies sollte einerseits zeigen, an welchen Stellen des Replikationszyklus Gemeinsamkeiten vorliegen und andererseits Informationen darüber geben, ob die Replikation virusspezifisch und/oder zellabhängig reguliert wird. Um den Verlauf einer OPV-Infektion beschreiben zu können, wurden jeweils der Zeitpunkt der DNA-Replikation sowie die Dauer eines Replikationszyklus ermittelt. Ferner wurde stellvertretend für die Vielzahl von OPV-Genen die Transkription von ausgewählten Virusgenen mit bekannter Funktion und Rolle in verschiedenen Phasen des Replikationszyklus untersucht. Diese Gene spielen eine Rolle bei der viralen Transkription (*D6R*, *G8R*, *D7R*), der DNA-Replikation (*K4L*), der Virusmorphogenese (*D8L*, *A27L*, *A56R*) oder als Immunmodulatoren (*C12L*, *crmD*, *B28R*, *A53R*, *E3L*, *B16R*). Für einen Teil dieser Gene waren die Nachweissysteme bereits etabliert, für die OPV-Gene *K4L*, *D8L*, *A27L*, *C12L* und *E3L* wurden sie in dieser Arbeit neu entwickelt (3.1.1).

Für die Infektionsversuche wurden vier verschiedene OPV verwendet: die Impfstämme VACV-LE und VACV-MVA-BN, das CMLV-CP-19 sowie das Calpoxvirus. VACV-MVA ist ein stark attenuiertes Virus, da es während der mehr als 570 Passagen auf CEF-Zellen ca. 15% seines Genoms verloren hat und nur in Hühnerzellen replizieren kann [67]. Diese Virus kann eine Vielzahl von Mammalia-Zellen infizieren, aber ohne in diesen infektiöse Partikel zu bilden [101]. Das CMLV weist innerhalb der OPV die phylogenetisch engste Verwandtschaft zum VARV auf. Dennoch ist das Wirtsspektrum auf Kamele und Dromedare begrenzt und Infektionen des Menschen sind bisher nicht beschrieben [3,102]. Nach einem Pockenausbruch bei Neuweltaffen in einem deutschen Privatzoo wurde das Calpoxvirus 2002 von unserer Arbeitsgruppe aus *Callithrix jacchus* isoliert [7]. Das Calpoxvirus zeigt phylogenetisch die größte Verwandtschaft zu den CPXV und ist hoch pathogen für *Callithrix jacchus* [8]. Bis jetzt gibt es keine Hinweise, dass das Calpoxvirus eine pockenartige Erkrankung beim Menschen hervorrufen kann [7].

3.1.1 Etablierung von real-time PCR-Systemen für *K4L*, *D8L*, *A27L*, *C12L* und *E3L*

Um die Expression der OPV-Gene *K4L*, *D8L*, *A27L*, *C12L* und *E3L* in Zellkultur verfolgen zu können, wurden sensitive real-time PCR-Systeme etabliert. Dazu wurden die OPV-Gene mit spezifischen Primern amplifiziert, die PCR-Produkte in der Gelelektrophorese analysiert und die Amplifikate in den pCR®II-TOPO®-Vektor kloniert. Vektoren, die das Insert tragen, wurden dann in einem Flüssigkulturansatz vermehrt und die Plasmide präpariert. Von den Plasmiden wurden Verdünnungsreihen von 10^6 - 10^1 Kopien pro Ansatz erstellt, die in jeden PCR-Optimierungslauf eingesetzt wurden. Für die Optimierung gilt, je niedriger der C_T -Wert ist, desto früher findet eine messbare Amplifikation statt und desto effizienter verläuft die PCR-Reaktion. Für jedes der Nachweissysteme wurde zunächst die optimale Annealingtemperatur von 55°C für *D8L* und *E3L*, 58°C für *K4L* und *C12L*, sowie von 60°C für die *A27L*-PCR ermittelt.

Es wurde versucht, alle real-time PCR-Systeme mit dem kostengünstigeren SYBR® Green-Sondenformat zu etablieren. Mit SYBR® Green können jedoch durch Dimer-Bildung von Primern falsch positive Signale entstehen, weshalb die Amplifikationsbedingungen für alle Assays gesondert etabliert werden mussten. Zuerst wurde die Primerkonzentration variiert, um die falsch positiven Signale zu reduzieren. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die C_T -Werte der einzelnen Plasmidverdünnungsstufen und damit die Effizienz der PCR nicht verschlechtern. In die PCR-Assays für *K4L*, *E3L*, *C12L* und *A27L* konnten daraufhin 160 nmol des jeweiligen sense und antisense Primers und für *D8L* 300 nmol eingesetzt werden.

Da die Primerdimere in den Negativkontrollen noch falsch positive Signale lieferten, wurde im Anschluss an die Annealing- und Elongationsphase ein spezifischer Denaturierungsschritt eingefügt, bei welchem Primerdimere bereits abschmelzen und die PCR-Produkte noch erhalten bleiben. An dieser Stelle erfolgte gleichzeitig die Messung des Fluoreszenzsignals für das spezifische PCR-Produkt. Die dafür notwendige Schmelzpunktanalyse wurde zuvor am Light Cycler durchgeführt und die ermittelte Schmelztemperatur schrittweise auf den real-time PCR-Ansatz übertragen. Die Messschritte sind für *K4L* 10 Sek. bei 84°C sowie für *E3L* und *C12L* 10 Sek. bei 82°C. Die Templates für die *D8L*- und die *A27L*-PCR sind während der Schmelzanalyse bei der gleichen Temperatur wie ihre jeweiligen Primerdimere abgeschmolzen. Diese konnten folglich nicht durch einen zusätzlichen Denaturierungsschritt in der real-time PCR auseinandergehalten werden. Deshalb wurde für diese beiden Systeme eine spezifische MBG-Sonde entwickelt und in die PCR eingesetzt.

3.1.2 Bringen Pockenviren ihre RNA mit?

Mit Hilfe der Infektionskinetiken soll unter anderem ermittelt werden, zu welchen Zeitpunkten bestimmte OPV-Gene im Verlauf des Replikationszyklus exprimiert werden. Dadurch, dass in der späten Phase der Virusreplikation das vollständige Transkriptionssystem für die Expression der frühen Gene im Viruscore verpackt wird [12], sollte an dieser Stelle untersucht werden, ob auch virale RNA in den Viruspartikeln verpackt wird. Mitgebrachte RNA würde zu den frühen Zeitpunkten der Infektion eine Transkription von viralen Genen vortäuschen und damit die Expressionsanalysen beeinflussen.

Für die Untersuchung wurde RNA sowohl aus RNase-behandelten und -unbehandelten Virusstocks von Calpoxvirus, CMLV-CP-19, VACV-MVA-BN und VACV-LE präpariert, cDNA synthetisiert und die OPV-mRNA von *D7R*, *D8L*, *G8R*, *K4L* und *A27L* in der real-time PCR gemessen. Zusätzlich wurden die Genomäquivalente anhand des *D7R*-Gens von DNase-behandelten Virusstocks ermittelt und die RNA-Kopien auf 10^4 Genomäquivalente pro ml normalisiert (Abb. 6). In den RNase-unbehandelten Virusstocks von Calpoxvirus, CMLV-CP-19 und VACV-LE wurde bei allen untersuchten Genen mehr RNA-Kopien gemessen als in den RNase-behandelten Stocks. Dieser Unterschied kann auf Partikel-assoziierte RNA, RNA aus aufgebrochenen Zellen oder Viruspartikeln zurückzuführen sein. Generell wurde nach dem RNase-Verdau in allen Virusstocks virale mRNA gemessen, welche folglich in den Viruspartikeln verpackt worden sein muss. Diese Ergebnisse hatten zur Folge, dass vor Beginn der Infektionsversuche alle Virusstocks mit RNase behandelt wurden, um freie oder Partikel-assoziierte virale RNA zu entfernen.

Ferner wurden von den untersuchten OPV unterschiedliche mRNA-Mengen in den Viruspartikeln verpackt. Die Bedeutung für die Infektiosität der Viren und deren Replikation in den Zellen ist unbekannt und wurde in dieser Arbeit auch nicht weiter untersucht.

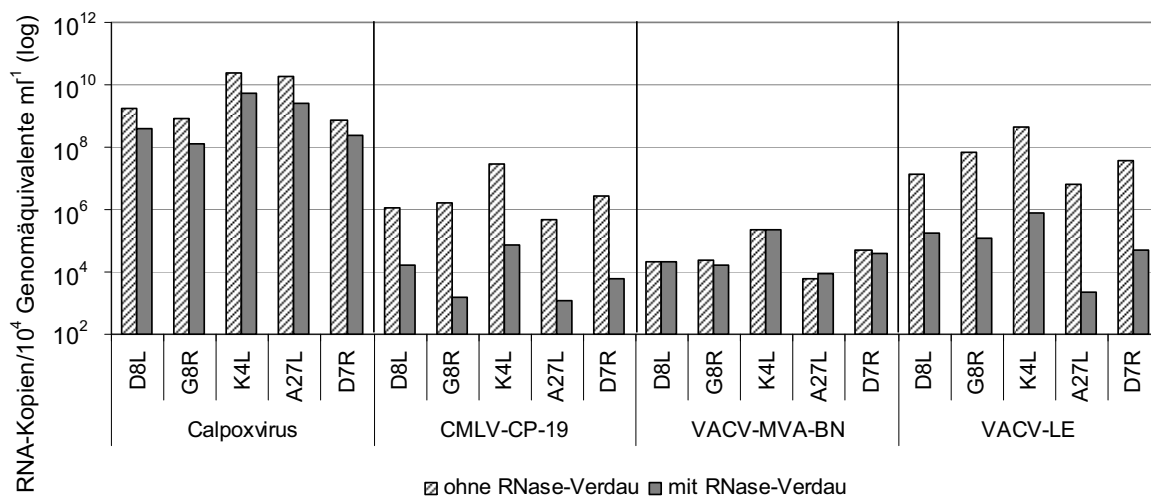


Abb. 6: Detektion von viraler mRNA in OPV-Partikeln. Aus RNase behandelten und –unbehandelten Virusstocks von Calpoxvirus, CMLV-CP-19, VACV-MVA-BN und VACV-LE wurde RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und die OPV-mRNA von *D8L*, *G8R*, *K4L*, *A27L* und *D7R* in der real-time PCR gemessen. Alle Viruspartikel enthielten virale mRNA, welche beim Assembly in Viruspartikel verpackt wurde.

3.1.3 Ermittlung der Infizierbarkeit humaner Zelllinien

Für die Durchführung der Infektionsversuche wurden verschiedene humane Zelllinien ausgewählt, die ihren Ursprung entweder im Larynx (HEp-2), der Niere (293), der Lunge (A-549), der Leber (Huh-7) oder den T-Zellen (HSB-2) haben. Dies sind alles Zellen, die nach einer systemischen OPV-Infektion in Organen von Tieren hohe Viruslasten aufwiesen [3,8].

Aus vorangegangenen Versuchen in unserer Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass HEp-2- und HSB-Zellen mit verschiedenen OPV-Viren infizierbar sind [103]. Die Zelllinien A-549, Huh-7 und 293 mussten erst noch auf ihre Infizierbarkeit mit Calpoxvirus untersucht werden. Dazu wurden die jeweiligen Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch-Platten ausgesät, infiziert und nach 24 Stunden im IFT überprüft, ob eine Infektion der Zellen stattgefunden hat. Alle Zelllinien konnten mit Calpoxvirus infiziert und folglich für die Infektionsversuche verwendet werden.

3.1.4 Infektion von humanen Zelllinien mit OPV

Zur Charakterisierung der OPV-Infektion *in vitro* wurden HEp-2 Zellen mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus bzw. die humanen Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 sowie HSB-2 mit Calpoxvirus infiziert (2.7) und sowohl die Virusreplikation als auch die Genexpression zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion untersucht. Die

Messwerte basieren auf Einfachwerten. Jedoch wurden alle Kinetiken mit drei verschiedenen MOIs (0,3, 0,03 und 0,003) durchgeführt und zeigten untereinander einen ähnlichen und damit reproduzierbaren Infektionsverlauf. Für die Auswertung wurden die Daten mit der MOI von 0,03 verwendet, da mit dieser die größte, messbare Zunahme in der Expression von Genen und Viruspartikeln bestimmt werden konnte.

3.1.5 Beschreibung des Replikationszyklus von OPV

In HEp-2-Zellen stieg bei den untersuchten Pockenviren 0,5 bis 2 Stunden p. i. die intrazelluläre Virus-DNA an und blieb bis 6 Stunden p. i. nahezu unverändert (Abb. 7). Im Zeitraum von 6 bis 9 Stunden und von 9 bis 25 Stunden p. i. nahm die Menge der intrazellulären Virus-DNA weiter zu. Nur bei VACV-LE, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus stieg die virale DNA auch in der Zeit von 25 bis 49 Stunden p. i. weiterhin an. Für VACV-MVA-BN wurde 49 Stunden p. i. annähernd die gleiche Menge an intrazellulärer Virus-DNA wie 9 Stunden p. i. gemessen. Der Anteil der extrazellulären Virus-DNA blieb bei VACV-LE, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus bis 6 Stunden p. i. konstant und nahm bei CMLV-CP-19 und Calpoxvirus bis 9 Stunden p. i. zu. Im Zeitraum von 9 bis 25 und von 25 bis 49 Stunden p. i. stieg die extrazelluläre Virus-DNA bei allen drei Pockenviren an. Die extrazelluläre Virus-DNA von VACV-MVA-BN blieb im gesamten Untersuchungszeitraum unverändert. Für alle Zeitpunkte wurde ebenso der infektiöse Virustiter ermittelt (Daten nicht gezeigt), nach welchem für VACV-LE, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus infektiöse Viruspartikel erst 25 und 49 Stunden p. i. detektiert werden konnten. Bei diesen Viren war der Titer 49 Stunden p. i. um den Faktor 100 höher als nach 25 Stunden. Von VACV-MVA-BN konnten erwartungsgemäß über die Zeit keine infektiösen Viruspartikel im Überstand nachgewiesen werden.

In den humanen Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 sowie HSB-2 nahm die intrazelluläre Virus-DNA von Calpoxvirus 0,5 bis 2 Stunden p. i. zu und blieb in A549-, Huh-7- und HSB-2-Zellen bis 9 Stunden p. i. unverändert (Abb. 7). Dahingegen stieg die intrazelluläre Virus-DNA in HEp-2- und 293-Zellen bereits 6 bis 9 Stunden p. i. weiter an. Neun bis 24 Stunden p. i. nahm die intrazelluläre Virus-DNA in allen Zelllinien zu und nur in HEp-2, A-549 und in HSB-2 Zellen gab es auch einen Anstieg der intrazellulären Virus-DNA in der Zeit zwischen 25 und 49 Stunden p. i. Der Anteil der extrazellulären Virus-DNA blieb in 293-, A-549- und HSB-2-Zellen bis 9 Stunden p. i. konstant und stieg dann 9 bis 25 bzw. 25 bis 49

Stunden p. i. weiter an. In HEp-2 gab es 6 bis 9 Stunden, 9 bis 25 sowie 25 bis 49 Stunden p. i. einen Anstieg in der extrazellulären Virus-DNA. Die extrazelluläre Virus-DNA in HSB-2-Zellen zeigte erst 25 bis 49 Stunden p. i. einen Anstieg. Der infektiöse Virustiter von Calpoxvirus (Daten nicht gezeigt) konnte in allen Zelllinien 25 (10^3 bis 10^4 PFU/ml) und 49 (10^4 bis 10^5 PFU/ml) Stunden p. i. bestimmt werden. In A-549, Huh-7 und HSB-2-Zellen konnten 49 Stunden p. i. mit $1-2 \times 10^5$ PFU/ml die höchsten Virustiter erzielt werden.

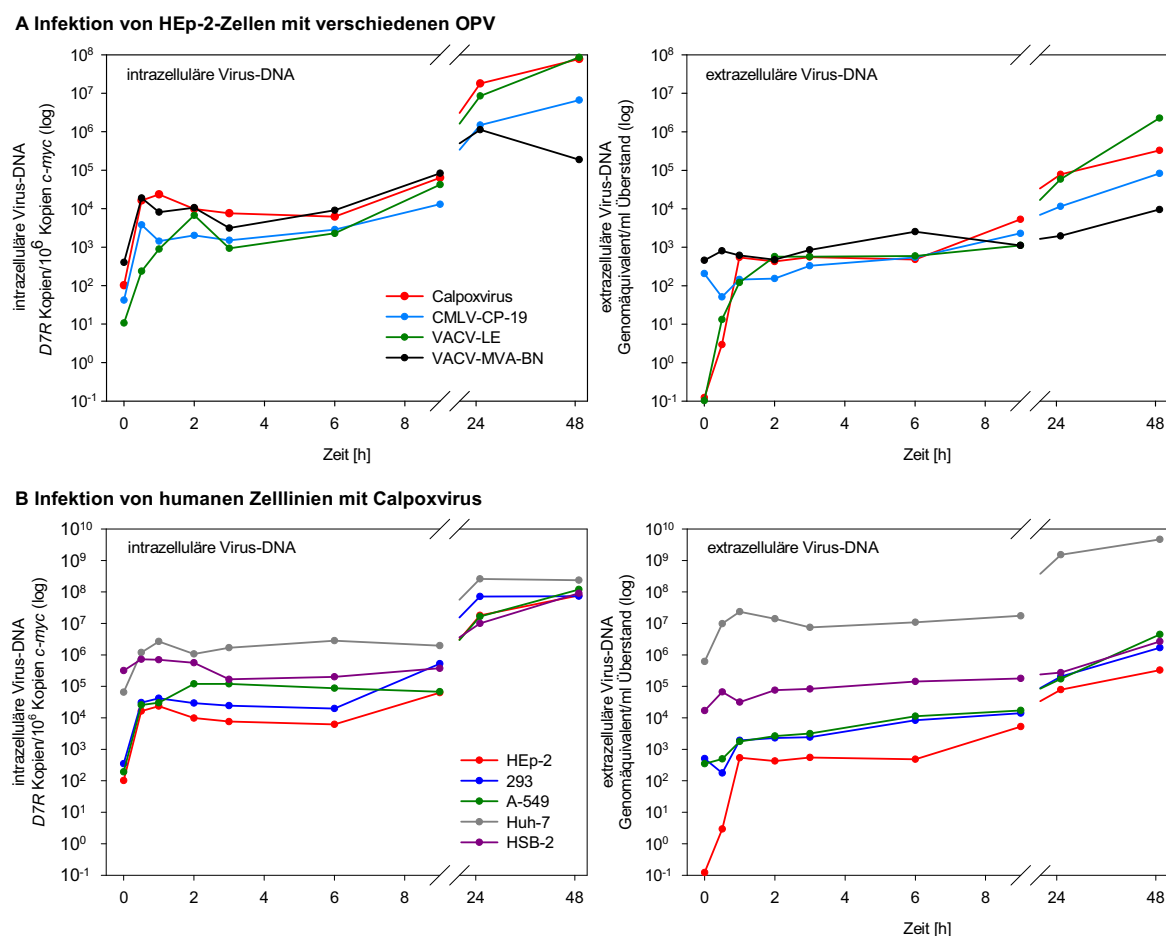


Abb. 7: Replikation von OPV in humanen Zelllinien. (A) HEp-2-Zellen wurden mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus sowie (B) die Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 Calpoxvirus infiziert. Als Maß für die Virusreplikation wurde die Menge der intrazellulären und der extrazellulären Virus-DNA gemessen. Dargestellt sind die Messwerte ($n=1$) für eine MOI von 0,03. Ein ähnlicher Infektionsverlauf konnte für die MOIs von 0,3 und 0,003 ermittelt werden.

In den Untersuchungen, die die Freisetzung von zellfreiem Virus verfolgen, konnten von Beginn der Infektion in Huh-7- und HSB-2-Zellen offensichtlich eine hohe Zahl von Viren im Überstand nachgewiesen werden. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die Viruspartikel zwar an die Zellen adsorbieren, aber nicht von den Zellen aufgenommen werden und im Laufe der Inkubation der Zellen wieder freigesetzt werden.

Der Replikationszyklus von OPV wurde über einen Zeitraum von 49 Stunden untersucht. Durch den Anstieg der intrazellulären Virus-DNA in den ersten zwei Stunden p. i. kann die DNA-Replikation auf diesen Zeitraum eingegrenzt werden. Die Zunahme in der intrazellulären und der extrazellulären Virus-DNA (jeweils 6 bis 9 Stunden p. i.) sowie der Nachweis des infektiösen Virustiters 25 Stunden p. i. zeigen, dass der erste Replikationszyklus von VACV-LE, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus nach ca. 9 Stunden abgeschlossen ist. Die Virusreplikation von VACV-MVA-BN wurde in HEp-2-Zellen nicht vollendet, da keine infektiösen Viruspartikel detektiert werden konnten.

3.1.6 Expression von OPV-Genen

Während des Replikationszyklus werden die OPV-Gene in den drei aufeinanderfolgenden Phasen der frühen, mittleren und späten Transkription exprimiert [25]. Die entstandenen Genprodukte werden dann entweder in derselben oder der darauffolgenden Phase für die Virusreplikation benötigt [37]. Um Gene zu identifizieren, die innerhalb des Replikationszyklus eine wichtige Rolle übernehmen bzw. deren Expression bei OPV gleich reguliert wird, wurde die Genexpression von vier verschiedenen OPV untersucht. Dazu wurde die mRNA von OPV-Genen gemessen, deren Genprodukte eine Rolle bei der Regulation der viralen Genexpression oder DNA-Replikation, der Virusmorphogenese oder als Immunmodulatoren spielen (3.1).

3.1.6.1 Regulatorische Gene

Zu den regulatorischen Genen zählen beispielsweise die Transkriptionsfaktoren VETF (*D6R*) und VLTF-1 (*G8R*), welche in der frühen bzw. späten Transkriptionsphase benötigt werden [27,33]. *D7R* ist eine Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase [104]. Die Polymerase nimmt eine der wichtigsten Funktionen ein, da sie für die Transkription sämtlicher OPV-Gene verantwortlich ist [25]. Als eine Komponente der DNA-Replikation wurde die Expression von *K4L* gemessen [40,41,42].

Nach der Infektion von HEp-2-Zellen mit den verschiedenen OPV konnte innerhalb der ersten 30 Minuten in allen Ansätzen *D7R*-mRNA detektiert werden (Abb. 8). Die Expression von *D6R* wurde bei VACV-LE 2 Stunden sowie bei Calpoxvirus und VACV-MVA-BN 3 Stunden p. i. nachgewiesen. Dagegen wurde *D6R* von CMLV-CP-19 bereits 0,5 Stunden p. i. exprimiert. *G8R* wurde von allen Viren spät (>3 Stunden) während der Infektion

transkribiert. Bei allen Viren wurde *D6R* zeitlich vor *G8R* exprimiert. Die Transkription von *K4L* erfolgte bei Calpoxvirus und VACV-MVA-BN 1 Stunde p. i. und in VACV-LE oder CMLV-CP-19 infizierten Zellen wurde *K4L* 2 Stunden p. i. exprimiert. Die Expression von *K4L* verlief bei Calpoxvirus, VACV-LE und VACV-MVA-BN zeitlich vor der Transkription der beiden Transkriptionsfaktoren. Im Gegensatz dazu wurde bei CMLV-CP-19 erst *D6R* und dann *K4L* transkribiert. Einmalig zu Beginn der Infektion gemessene *G8R*- oder *K4L*-mRNA kann hier auf in Viruspartikel verpackte mRNA zurückzuführen sein.

Die Infektion mit Calpoxvirus zeigte, dass *D7R* in allen humanen Zelllinien gleich zu Beginn der Infektion detektiert werden konnte (Abb. 8). *D6R*-mRNA wurde in den Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachgewiesen. Während in Huh-7-, 293- und in A-549-Zellen die Expression zwischen 0 und 1 Stunde p. i. erfolgte, wurde *D6R*-mRNA in HEp-2- und HSB-2-Zellen 3 Stunden p. i. gemessen. Die Transkription von *G8R* verlief in den Zelllinien sehr ähnlich. Wurde diese mRNA in HEp-2, 293 und A-549 erst mehr als 3 Stunden p. i. exprimiert, zeigte diese in den Zelllinien Huh-7 und HSB-2 nach dieser Zeit einen weiteren Anstieg von >100 Kopien ab Beginn der Infektion. Die zu Beginn der Infektion gemessene *G8R*-mRNA ist wahrscheinlich auf die in den Viruspartikeln verpackte RNA zurückzuführen. Die Transkription von *K4L* wurde in allen Zelllinien ≥ 1 Stunde p. i. induziert und verlief zeitlich vor der Transkription der beiden Transkriptionsfaktoren.

3.1.6.2 Strukturgene

Strukturgene kodieren für die viralen Strukturproteine, welche für die Morphogenese des Virus benötigt werden. Exemplarisch wurde hier die Expression der Oberflächenproteine *D8L*, *A27L* und *A56R* untersucht [18,62,105].

In HEp-2-Zellen wurde *D8L* bereits 1 Stunde p. i. von allen OPV transkribiert (Abb. 9). *A27L* konnte in VACV-LE- und VACV-MVA-BN-infizierten Zellen 1 bis 2 Stunden p. i. nachgewiesen werden. Die Ermittlung des Transkriptionsstarts für *A27L* bei CMLV-CP-19 oder Calpoxvirus war schwierig, da in den jeweiligen Viruspartikeln wahrscheinlich *A27L*-mRNA enthalten war und die Menge der RNA mit ca. 100 Kopien zwischen 0 und 1 Stunde p. i. bereits so hoch war, wie sie bei den beiden anderen Viren erst nach mehr als 2 Stunden p. i. erreicht wurde. Aus den gleichen Gründen konnte der Transkriptionsstart für *A56R* nicht für CMLV-CP-19 bestimmt werden. Bei Calpoxvirus begann die *A56R*-Expression 1 Stunde

p. i. und bei den VACV-LE und VACV-MVA-BN 2 Stunden p. i. Insgesamt wurden die untersuchten Strukturgene von allen Viren innerhalb der ersten 2 Stunden p. i. exprimiert.

In allen fünf Zelllinien wurde die Expression von *D8L* sowie *A56R* 1 Stunde p. i. induziert (Abb. 9). *A27L*-mRNA konnte in allen Zelllinien ab dem Zeitpunkt der Infektion detektiert werden. Hier scheint wiederum die in den Viruspartikeln bereits vorhandene mRNA die Bestimmung der Transkriptionskinetik zu erschweren. In HEp-2-, Huh-7- und HSB-2-Zellen war die Menge an *A27L*-mRNA mit ca. 1000 Kopien in den ersten drei Stunden p. i. höher als in 293- oder A-549-Zellen mit 10 bis 100 Kopien. In diesen beiden Zelllinien stieg die Menge an *A27L*-mRNA erst nach drei Stunden auf das Niveau in HEp-2-, Huh-7- und HSB-2-Zellen an.

3.1.6.3 Immunmodulatorische Gene

Die Wirtsspezifität von OPV ist abhängig von effektiven Immunevasionsstrategien, die sich von einem Virus zum anderen unterscheiden können [6]. Deshalb wurde hier die Expression von verschiedenen immunmodulatorischen Proteinen untersucht, die nicht von allen OPV exprimiert werden können (Tab. 19). Dies sollte zeigen, ob die jeweiligen Immunmodulatoren im Vergleich zu den anderen Viren zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Einige der untersuchten immunmodulatorischen Gene kodieren für lösliche Rezeptoren und können freie Zytokine wie IL-1 β (*B16R*) [54], IL-18 (*C12L*) [56] oder TNF α/β (*B28R*, *A53R* oder *crmD*) [59,60] binden. Das *E3L*-Protein verhindert durch die Bindung an dsRNA die Aktivierung der IFN- α und - β induzierten Signalkaskade [57].

Tab. 19: Immunmodulatorische Gene in OPV-Genomen¹

OPV	<i>B16R</i>	<i>C12L</i>	<i>B28R</i>	<i>A53R</i>	<i>crmD</i>	<i>E3L</i>
Calpoxvirus	+	+	+	+	+	+
CMLV-CP-19	+	-	+	+	+	+
VACV-LE	+	+	+	+	-	+
VACV-MVA-BN	+	+	-	-	-	+

¹ Die Datenzusammenstellung erfolgte auf der Grundlage von Sequenzvergleichen des entsprechenden Gens mit den aufgeführten OPV-Genomen in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov). + , Gen vorhanden und funktionsfähig; - Gen nicht vorhanden oder teilweise deletiert

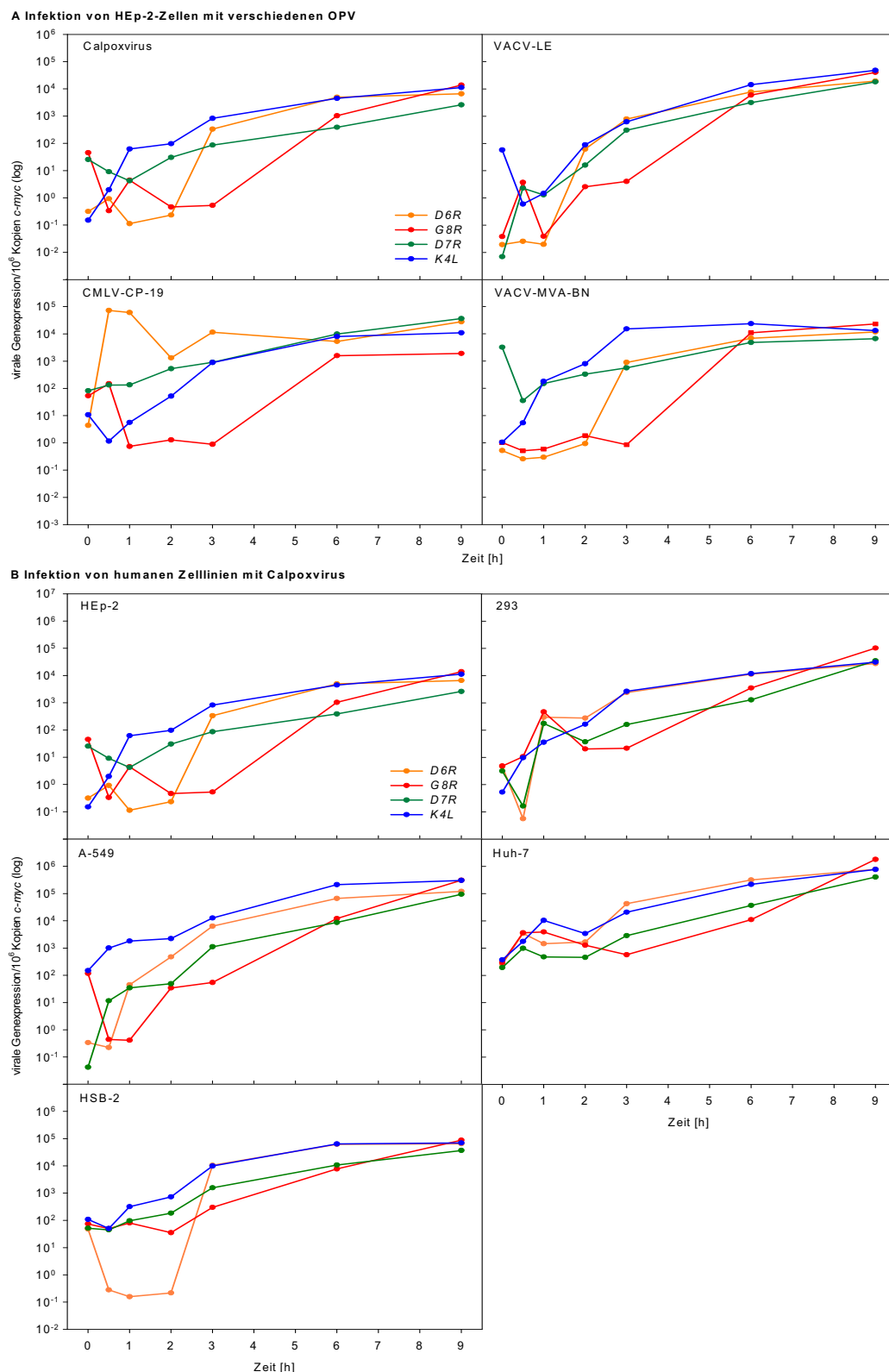


Abb. 8: Expression von regulatorischen OPV-Genen. (A) Hep-2-Zellen wurden mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus sowie (B) die Zelllinien Hep-2, 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 mit Calpoxvirus infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression der OPV-Gene *D6R*, *G8R*, *D7R*, *K4L* sowie des zellulären „housekeeping“-Gens *c-myc* quantitativ in der real-time PCR bestimmt. Die Kopienzahlen der jeweiligen OPV-mRNA wurden auf 10^6 Kopien *c-myc*-mRNA normalisiert. Dargestellt sind die Messwerte ($n=1$) für eine MOI von 0,03. Ein ähnlicher Infektionsverlauf konnte für die MOIs von 0,3 und 0,003 ermittelt werden.

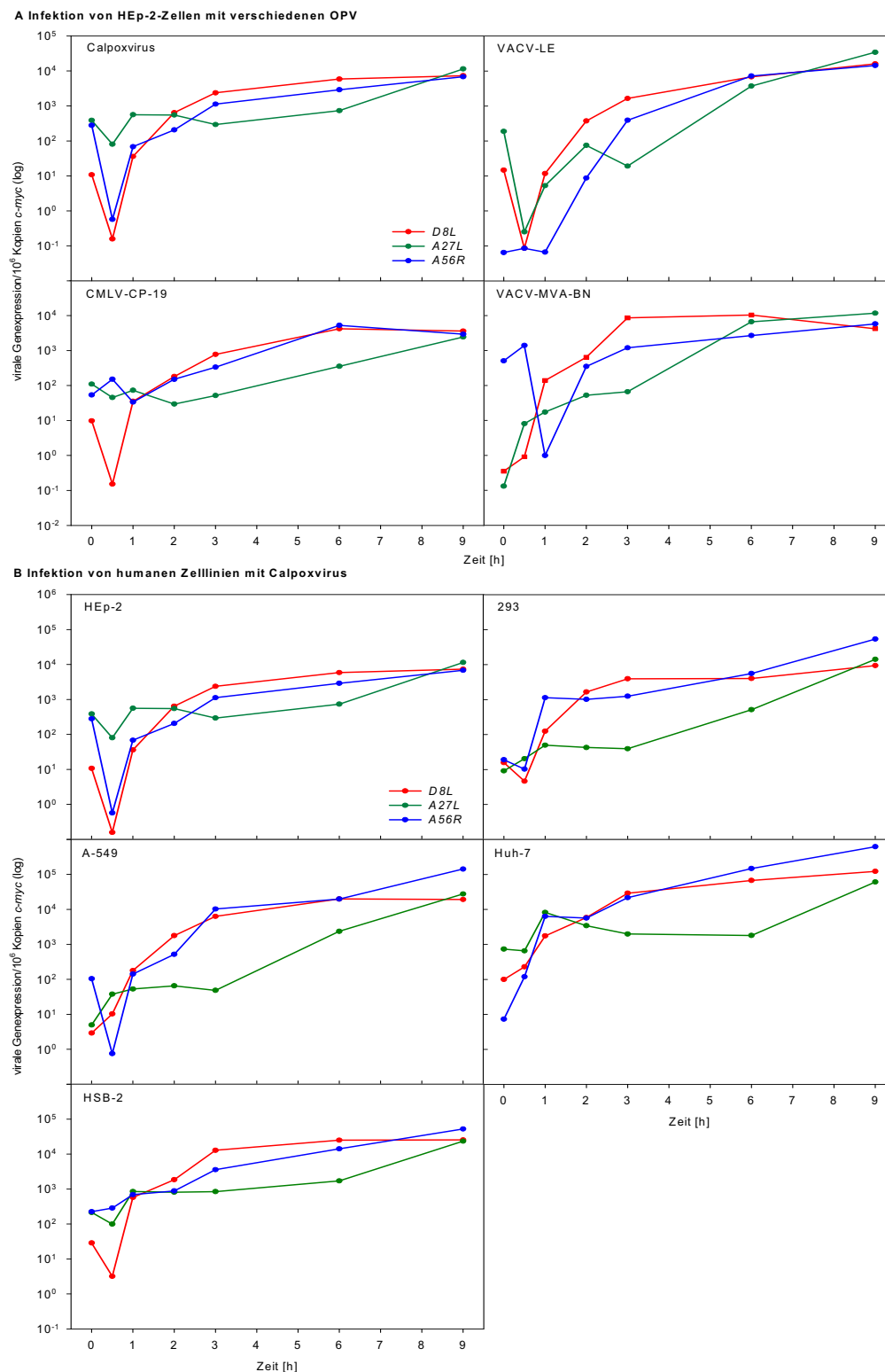


Abb. 9: Expression von Strukturgenen. (A) HEp-2-Zellen wurden mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus sowie (B) die Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 mit Calpoxvirus infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression der OPV-Gene *D8L*, *A27L*, *A56R* sowie die Expression des zellulären „housekeeping“-Gens *c-myc* quantitativ in der real-time PCR bestimmt. Die Kopienzahlen der jeweiligen OPV-mRNA wurden auf 10^6 Kopien *c-myc*-mRNA normalisiert. Dargestellt sind die Messwerte ($n=1$) für eine MOI von 0,03. Ein ähnlicher Infektionsverlauf konnte für die MOIs von 0,3 und 0,003 ermittelt werden.

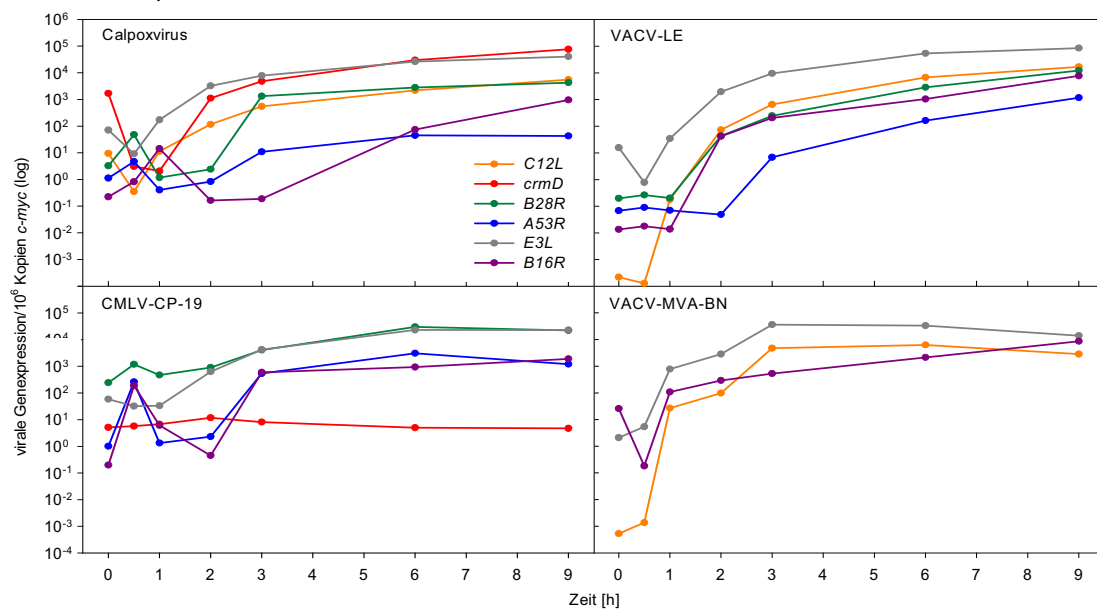
Die beiden Immunmodulatoren *E3L* und *B16R* werden von allen untersuchten OPV exprimiert (Abb. 10). Die Expression von *E3L* begann bei Calpoxvirus, VACV-LE und VACV-MVA-BN 1 Stunde p. i. und wurde als erstes immunmodulatorisches Gen exprimiert. In CMLV-CP-19-infizierten Zellen wurde *E3L* 2 Stunden p. i. transkribiert. Die Expression von *B16R* erfolgte in Abhängigkeit der untersuchten Virusspezies zu unterschiedlichen Zeiten p. i. Die früheste Expression wurde bei VACV-MVA-BN und VACV-LE zwischen 1 und 2 Stunden p. i. nachgewiesen. Bei CMLV-CP-19 erfolgte die Transkription 3 Stunden p. i. und bei Calpoxvirus nach 6 Stunden.

C12L-mRNA konnte bei Calpoxvirus und VACV-MVA-BN 1 Stunde und bei VACV-LE 2 Stunden p. i. nachgewiesen werden.

Nur Calpoxvirus und CMLV-CP-19 haben alle drei der untersuchten TNF-Rezeptoren exprimiert und die Expression unterschiedlich reguliert. *B28R* wurde von Calpoxvirus 3 Stunden p. i. exprimiert. In CMLV-CP-19-infizierten Zellen wurde bereits zum Zeitpunkt der Infektion *B28R*-mRNA nachgewiesen, wodurch der Transkriptionsstart nicht genau festgelegt werden konnte. Vermutlich wurde die *B28R*-mRNA in die CMLV-Partikel verpackt, wodurch diese zu Beginn der Infektion gemessen werden konnte. *B28R* wurde ebenso von VACV-LE exprimiert. Die Transkription erfolgte dort 2 Stunden p. i. Sowohl von Calpoxvirus, CMLV-CP-19 und von VACV-LE wurde *A53R* 3 Stunden p. i. exprimiert. Die Transkription von *crmD* erfolgte nur bei Calpoxvirus und CMLV-CP-19. Während *crmD* bei CMLV-CP-19 über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr schwach exprimiert wurde, erfolgte eine deutliche Transkription bei Calpoxvirus 3 Stunden p. i.

Die Expression der immunmodulatorischen Gene von Calpoxvirus wurde in den humanen Zelllinien im Wesentlichen gleich reguliert, wobei jeweils ein dreistufiges Expressionsmuster zu erkennen war (Abb. 10). 1 Stunde p. i. wurden die Gene *E3L* und *crmD* transkribiert. *B28R* und *C12L* wurden ca. 1 bis 2 Stunden p. i. exprimiert. In HEp-2-Zellen wurde *B28R* erst 3 Stunden p. i. exprimiert. Die Expression von *B16R* und *A53R* erfolgte in allen Zelllinien ≥ 2 Stunden p. i.

A Infektion von HEp-2-Zellen mit verschiedenen OPV



B Infektion von humanen Zelllinien mit Calpoxvirus

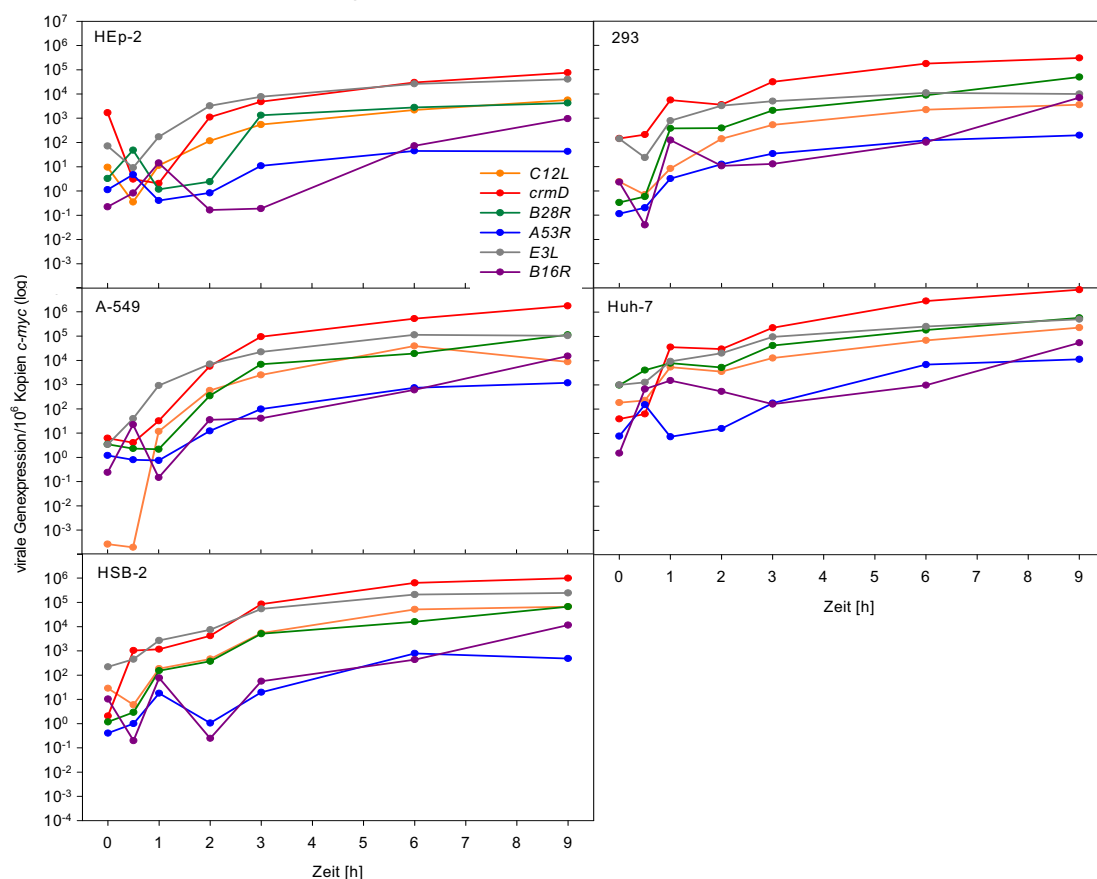


Abb. 10: Expression von immunmodulatorischen OPV-Genen. (A) HEp-2-Zellen wurden mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus sowie (B) die Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 mit Calpoxvirus infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression der OPV-Gene *B28R*, *A53R*, *crmD*, *E3L*, *C12L*, *B16R* sowie die des zellulären „housekeeping“-Gens *c-myc* quantitativ in der real-time PCR bestimmt. Die Kopienzahlen der jeweiligen OPV-mRNA wurden auf 10^6 Kopien *c-myc*-mRNA normalisiert. Dargestellt sind die Messwerte ($n=1$) für eine MOI von 0,03. Ein ähnlicher Infektionsverlauf konnte für die MOIs von 0,3 und 0,003 ermittelt werden.

3.1.6.4 Regulation der Genexpression von OPV

Die Infektionsversuche haben gezeigt, dass die regulatorischen Gene *D7R*, *G8R* und *K4L* unabhängig vom untersuchten Virus und der Zelllinie zu den gleichen Zeitpunkten während der Infektion exprimiert wurden (3.1.6.1). Es ist daher anzunehmen, dass deren Expression im Replikationszyklus von OPV gleich reguliert wird und diese Gene eine wichtige Rolle während der Replikation spielen. In weiteren Versuchen soll daher die Expression von *D7R* und *K4L* mit siRNA inhibiert und die Auswirkungen auf die Virusreplikation untersucht werden. Da *D7R* für eine Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert [104], könnte durch die Unterdrückung der Polymeraseaktivität die Transkription von OPV-Genen gehemmt werden. Von *K4L* ist die Funktion während der DNA-Replikation noch nicht vollständig bekannt [106]. Aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Regulation der *K4L*-Expression in den Versuchen, sollte für dieses Gen ebenfalls der Einfluss auf die Replikation untersucht werden.

Der Zeitpunkt der Transkription war für die Strukturgene *D8L*, *A27L* und *A56R* aufgrund der in den Viruspartikeln mitgebrachten RNA teilweise schwer zu bestimmen (3.1.6.2). In allen Infektionsversuchen konnte die jeweilige mRNA innerhalb der ersten 2 Stunden p. i. detektiert werden. Welche Rolle die frühe Expression der Gene bei der Virusreplikation oder Virusausbreitung spielen, wurde bisher nicht untersucht. Deshalb sollte die Hemmung der Genexpression mit RNAi in Hinblick auf die Virusreplikation untersucht werden.

Weiterhin wurde die Expression von sechs immunmodulatorischen Genen während eines Infektionszyklus miteinander verglichen (3.1.6.3). Bis auf das *E3L*-Gen wurden alle anderen Immunmodulatorgene zu unterschiedlichen Zeiten während der Infektion transkribiert. Die Expression scheint folglich virusspezifisch zu sein. Da die Transkription der Immunmodulatoren von Calpoxvirus in den humanen Zelllinien keine Unterschiede zeigte, erfolgte die Transkription der Immunmodulatorgene zellunabhängig. OPV verfügen über eine Vielzahl von Immunmodulatoren, die größtenteils virusspezifisch exprimiert werden und untereinander auch überlappende Funktionen übernehmen [60,61]. Eine Inhibition dieser Gene würde die Virusreplikation in Zellkulturen vermutlich nicht beeinflussen und soll nicht weiter untersucht werden.

3.2 Expression von rekombinanten OPV-Proteinen zur Antikörper-Gewinnung

In dieser Arbeit sollte ein siRNA-System für die Inhibition von OPV-Infektionen etabliert werden. Dazu wurden auf der Grundlage der Infektionskinetiken Zielgene ausgewählt. Um zu zeigen, dass die virale Genexpression durch RNAi reduziert wurde, sollte der Nachweis sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene erfolgen. Da unserer Arbeitsgruppe für die zu analysierenden OPV-Gene *D7R*, *K4L*, *A56R* und *D8L* keine Antikörper zur Verfügung standen, sollten diese Gene zunächst als rekombinante Proteine exprimiert und mit den aufgereinigten Proteinen Hühner immunisiert werden. Anschließend sollte mit Hilfe dieser polyklonalen Antikörper die Expression der jeweiligen OPV-Gene mit und ohne Inhibition durch RNAi im Western Blot verfolgt werden.

3.2.1 Herstellung von rekombinanten Plasmiden für *D7R*, *A27L*, *A56R* und *D8L*

Die OPV-Gene *D7R*, *A27L*, *A56R* und *D8L* wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und in den Expressionsvektor pTriEx-3 kloniert (2.22). Nach Überprüfung der jeweiligen Gensequenz wurde von den Klonen, die eine vollständige und auf Aminosäure-Ebene korrekte Sequenz enthielten, eine Maxi-Plasmid-Präparation (2.19) durchgeführt, um ausreichend DNA für die Expression der rekombinanten Plasmide zu erhalten. Von *D8L* konnte nur der N-terminale Teil in den Vektor kloniert werden, da nach der Klonierung des vollständigen Genes keine Klone erhalten wurden [107]. Die rekombinante Proteinexpression für *K4L* wurde in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

Unserer Arbeitsgruppe wurde von Prof. Dr. Dr. C.-P. Czerny (Georg-August-Universität, Göttingen) ein monoklonaler Maus-anti-A27-Antikörper zur Verfügung gestellt. Trotzdem wurde das *A27L*-Gen rekombinant exprimiert, damit es in dem zu etablierenden System für die rekombinante Proteinexpression als weitere Positivkontrolle verwendet werden konnte.

3.2.2 Expression der rekombinanten OPV-Proteine *D7*, *A27*, *A56* und *D8* in unterschiedlichen Expressionssystemen

Die OPV-Gene sollten in *E. coli* rekombinant exprimiert werden. Parallel wurde versucht, die Proteine in Mammalia-Zellkultur zu exprimieren.

3.2.2.1 Expression von D7, A27, A56 und D8 in der Zellkultur

Humane 293-Zellen wurden mit den rekombinanten Plasmiden transfiziert. Da nicht bekannt war, in welchem Zeitraum die Proteine in der Zelle exprimiert werden, wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Proteine isoliert. Als Transfektionskontrollen wurden zwei leere Vektoren, pTriEx-3 und BSSK, sowie ein Ansatz ohne DNA mitgeführt.

Zum Nachweis der Proteinexpression wurde ein Western Blot etabliert, bei welchem die rekombinanten Proteine über den Polyhistidin-Tag am C-Terminus mit einem monoklonalen His•Tag-Antikörper detektiert werden konnten. Zuerst wurde die Zusammensetzung der Blocking-Lösung, Waschpufferlösung sowie die einzusetzende Proteinmenge optimiert [107] und anschließend die Expression der OPV-Proteine untersucht. Generell konnte eine Expression von D7, A27 und D8 gezeigt werden (Abb. 11). A27 wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum gleich stark exprimiert. Die Expression von D8 und D7 nahm 48 bzw. 72 Stunden nach der Transfektion ab. Zusätzlich zur Detektion mit dem His•Tag-Antikörper wurde A27 für den 48 Stundenwert mit dem monoklonalen Maus-anti-A27-Antikörper nachgewiesen. Dies zeigt, dass die mit dem His•Tag-Antikörper detektierten Proteinbanden der verschiedenen rekombinant exprimierten Proteine verlässlich sind.

A56R konnte auch nach mehrmaliger Wiederholung der Transfektion in der Zellkultur nicht exprimiert werden. Allerdings konnten *A56R*-mRNA-Transkripte 48 und 72 Stunden nach der Transfektion in der real-time PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das heißt, dass die Ursachen für eine fehlende Proteinexpression bei der Translation oder den nachfolgenden posttranslationalen Prozessen liegen müssen.

3.2.2.2 Expression von D7 und A27 in *E. coli* RosettaTM (DE3)

Die Herstellung der rekombinanten OPV-Plasmide (2.22) wurde für die verschiedenen Targetgene nicht gleichzeitig durchgeführt, so dass als erstes die Plasmide für *A27L* und *D7R* vorlagen. Mit diesen Genen wurde deshalb die Proteinexpression in *E. coli* begonnen.

Zunächst wurde versucht, D7 und A27 in XL1-Blue MRF' Kan Supercompetent Zellen (Stratagene, La Jolla, US) zu exprimieren. Doch auch nach mehrmaliger Wiederholung unter veränderten Transformationsbedingungen konnten die Proteine in dieser Bakterien-Spezies nicht exprimiert werden. Erst mit der Verwendung des *E. coli* Stammes RosettaTM (DE3) konnte die Expression beider OPV-Proteine induziert werden. Da für A27 bereits ein

Antikörper vorlag, wurde nur für D7 die Expression in einem Maxi-Ansatz durchgeführt. D7 wurde als unlösliches Protein exprimiert, das nach der Expression in Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) vorlag und deshalb unter denaturierenden Bedingungen über eine Nickelsäule aufgereinigt wurde.

3.2.2.3 Immunisierung eines Huhns zur Produktion von IgY-Antikörpern

Das aufgereinigte und renaturierte D7-Protein wurde für die Gewinnung von Antikörpern an Prof. Dr. R. Schade (Charité, Berlin) weitergegeben. In dieser Arbeitsgruppe wurde ein Huhn mit dem rekombinanten D7-Protein immunisiert und die anti-D7-IgY-Antikörper anschließend aus dem Eidotter aufgereinigt.

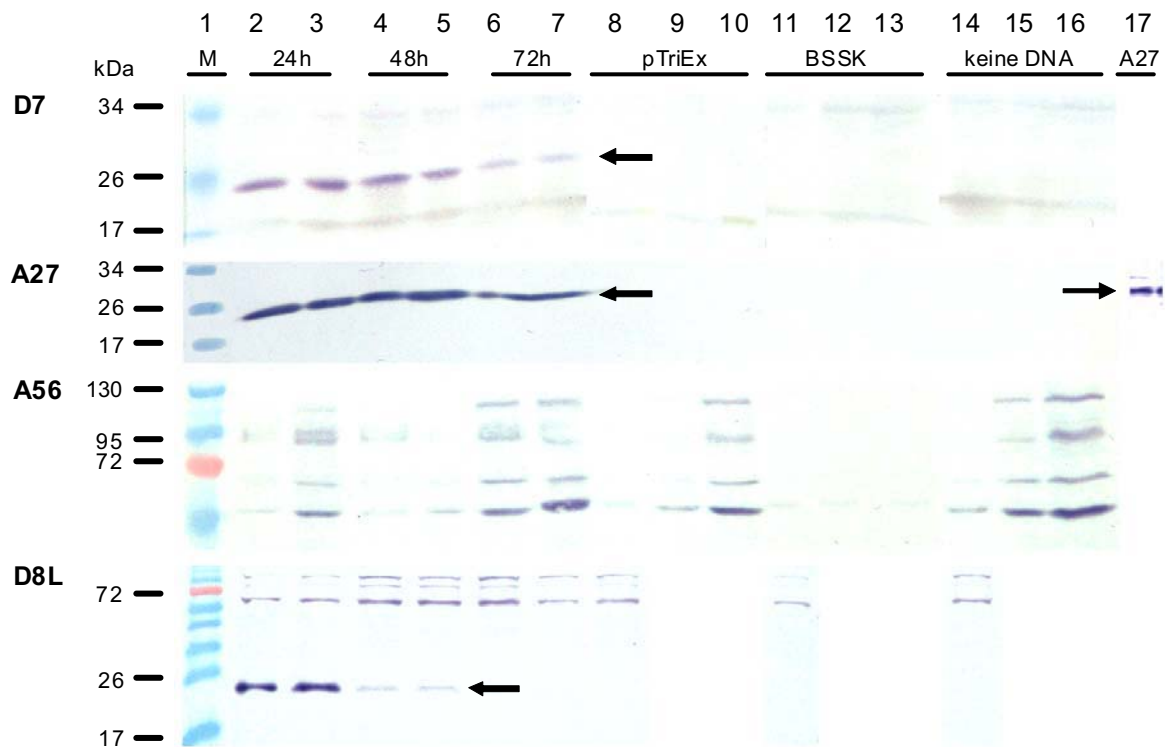


Abb. 11: Expression der rekombinanten Proteine D7, A27, A56 und D8 in 293-Zellen. Spur 1: 10-170 kDa Proteinmarker; Spur 2-3: rek. Protein nach 24 Stunden; Spur 4-5: rek. Protein nach 48 Stunden; Spur 6-7: rek. Protein nach 72 Stunden; Spur 8-10: pTriEx-3 nach 24, 48 und 72 Stunden; Spur 11-13: BSSK nach 24, 48 und 72 Stunden; Spur 14-16: keine DNA nach 24, 48 und 72 Stunden; Spur 17: Positivkontrolle für die rekombinate A27-Expression (48 Stundenwert), Detektion mit spezifischem, monoklonalem Maus-anti-A27-Antikörper; Die rekombinant exprimierten Proteine haben durch den C-terminal eingefügten His-Tag folgende Größen: D7=23kDa; A27=17,5 kDa; A56=92 kDa; D8=23 kDa.

3.3 Charakterisierung der D7- und A27-Antikörper

3.3.1 Reaktivität und Spezifität der Antikörper im IFT

Mit dem IFT sollte untersucht werden, ob die Antikörper die viralen D7- und A27-Proteine von verschiedenen OPV erkennen. Dazu wurden HEP-2-Zellen mit VACV-1354, VACV-MVA-BN, VACV-LE, CPXV-81-02 und Calpoxvirus infiziert, die infizierten Zellen auf Objektträger getropft und im indirekten IFT unter Verwendung des anti-D7-IgY-Antikörpers bzw. des Maus-anti-A27-Antikörpers auf die jeweiligen Antigene untersucht (Abb. 12).

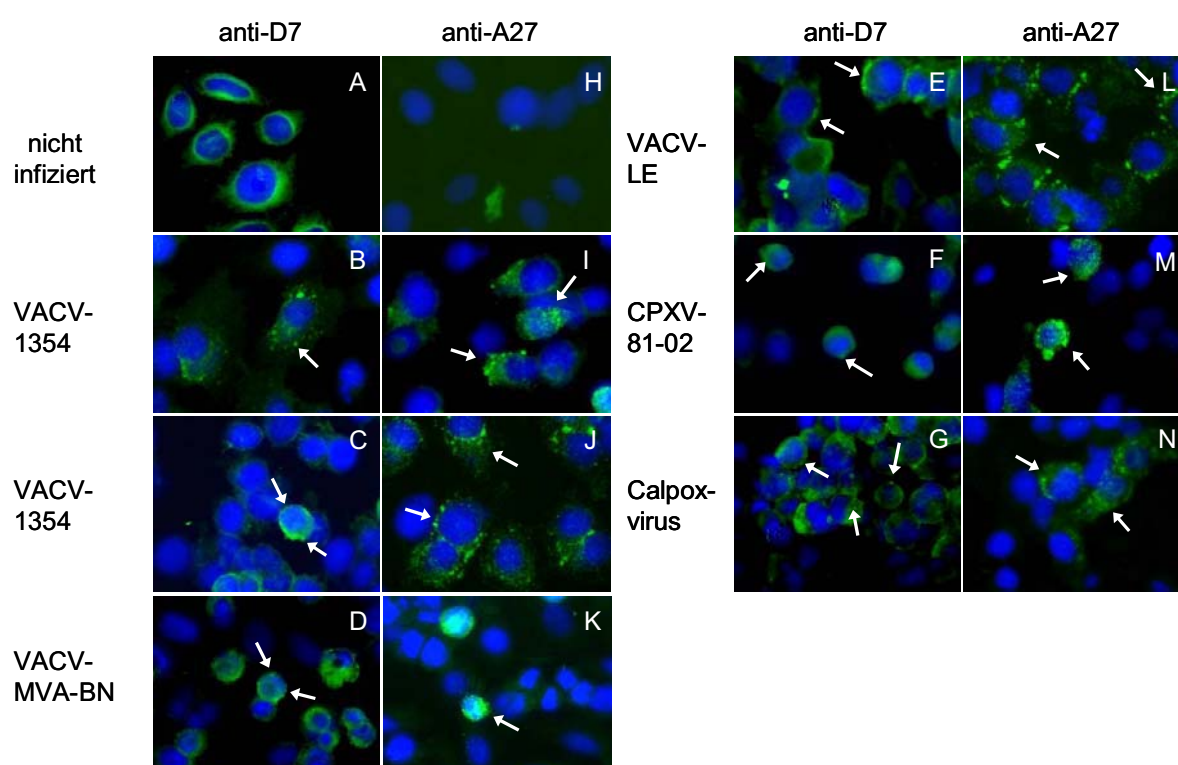


Abb. 12: IFT von OPV-Antigenen durch anti-D7-IgY-Antikörper sowie Maus-anti-A27-Antikörper. HEP-2-Zellen wurden mit den VACV-1354 (B, C, I, J), VACV-MVA-BN (D, K), VACV-LE (E, L), CPXV-81-02 (F, M) und mit Calpoxvirus (G, N) infiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen das virale D7- (A, C-G) und das A27-Protein (H, J-N) gefärbt. Nicht infizierte Zellen (A, H) wurden mit der niedrigsten eingesetzten Antikörperverdünnung gefärbt und dienten als Negativkontrolle (unspezifisches Hintergrundrauschen). Infizierte Zellen wurden zudem mit einer anti-Calpox-IgY-Antikörpermischung (B) und mit einem humanen Serum von VACV-geimpften Personen (I) gefärbt und dienten als Positivkontrolle für die jeweilige Infektion. Hier wurden nur die Positiv - und Negativkontrollen für die Infektion mit VACV-1354 dargestellt. OPV-infizierte Zellen erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün (siehe weißer Pfeil), die Zellkerne sind blau gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einer 40x Vergrößerung durchgeführt.

Der anti-D7-IgY-Antikörper zeigte in den Negativkontrollen eine unspezifische, grüne Hintergrundfärbung. Jedoch konnten bei allen untersuchten OPV bis zu einer Verdünnung von 1:200 eine spezifische Anfärbung der infizierten Zellen detektiert werden. Dies

bedeutet, dass mit diesem Antikörper eine Expression des Proteins in VACV-1354-, VACV-MVA-BN-, VACV-LE-, CPXV-81-02- und Calpoxvirus-infizierten Zellen nachgewiesen werden kann und dass der Antikörper das virale D7-Protein aller untersuchten OPV erkennt. Eine spezifische Färbung der infizierten Zellen durch den Maus-anti-A27-Antikörper konnte bei den untersuchten OPV bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} gezeigt werden. Das heißt, dieser Antikörper erkennt ein gemeinsames Epitop auf dem A27-Protein der untersuchten Viren und kann daher für den Nachweis des Antigens in OPV-infizierten Zellen eingesetzt werden. Generell zeigte der Maus-anti-A27-Antikörper ein starkes Fluoreszenzsignal ohne eine Hintergrundfärbung wie der polyklonale anti-D7-IgY-Antikörper hervorzurufen.

3.3.2 Reaktivität der Antikörper im Western Blot

Neben der Untersuchung der Antikörper im IFT wurde die Reaktivität gegen die viralen D7- und A27-Proteine ebenso im Western Blot getestet. Dazu wurden aufgereinigte IgY-Antikörper aus Hühnereiern nach der ersten bzw. zweiten Boost-Immunisierung in unterschiedlichen Konzentrationen (unverdünnt, 1:10, 1:20, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000) auf eine Nitrozellulosemembran getropft und eine Immunodetektion wie im Western Blot durchgeführt. Dies sollte zeigen, ob der für den Western Blot gedachte Sekundärantikörper Donkey-anti-chicken IgY (IgG) APC (APC, alkalische Phosphatase markiert) den IgY-Antikörper erkennt und in welcher Verdünnung der anti-D7-IgY-Antikörper zukünftig im Western Blot eingesetzt werden kann. In allen Chargen konnte bis zu einer 1:200 Verdünnung des anti-D7-IgY-Antikörpers ein signifikantes Signal erzielt werden. Daraufhin wurden die viralen Proteine aus Calpoxvirus-infizierten 293-Zellen in unterschiedlichen Mengen über eine SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei der anschließenden Immunodetektion wurde der anti-D7-IgY-Antikörper sowohl in einer 1:100 und 1:200 Verdünnung eingesetzt. Doch mit beiden Verdünnungen konnte das virale D7-Protein nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran zu wenig oder die spezifischen Bindungsstellen zu stark geblockt wurden, wurde die Milchpulverkonzentration (0,5%, 1%, 2%, 10%) in der Blocking-Lösung variiert bzw. 5% FKS mit 1% BSA in PBS mit 0,1% Tween als Blocking-Lösung eingesetzt. Auch durch diese Veränderungen konnte das virale D7-Protein nicht detektiert werden. Als nächstes wurde überprüft, wo die Nachweisgrenze für das rekombinante D7-Protein im Western Blot liegt und welchen Einfluss die Verdünnung des anti-D7-IgY-Antikörpers auf die Detektion hat (Abb. 13).

Dafür wurden zwei Proteingele mit einer seriellen Verdünnung von 500 ng bis 5 fg des rekombinanten D7-Proteins beladen und im Western Blot mit zwei verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1:200 und 1:2000) untersucht. Es konnten jeweils sicher 5 ng des rekombinanten D7-Proteins nachgewiesen werden. Mit der 1:200 Verdünnung wurden sogar bis zu 0,5 ng des rekombinanten Proteins detektiert. Dies bestätigt, dass die zuvor verwendete Antikörperkonzentration nicht zu niedrig gewählt wurde, sondern die in infizierten Zellen gebildete Menge an viralem D7 so niedrig ist, dass diese im Western Blot unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Dadurch, dass mit dem anti-D7-IgY-Antikörper das virale D7-Protein bereits im IFT detektiert und mit diesem das rekombinante D7-Protein im Western Blot nachgewiesen werden konnte, wurde gezeigt, dass der im Huhn gebildete polyklonale Antikörper *per se* für die Untersuchungen geeignet ist.

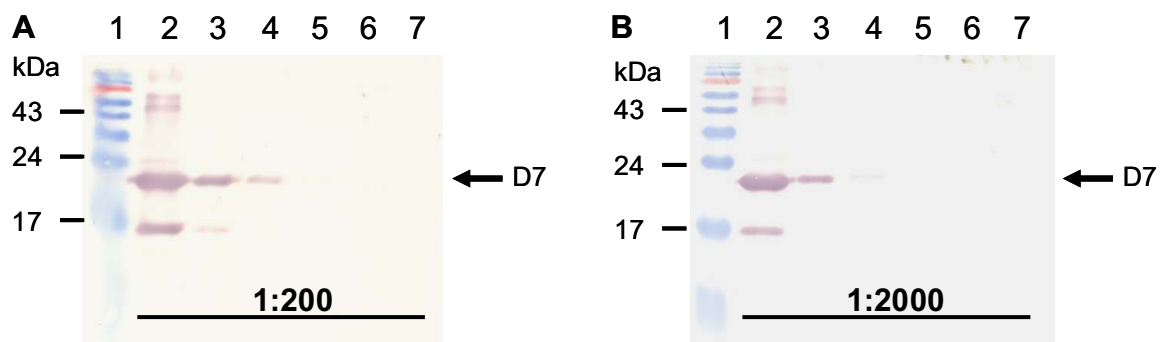


Abb. 13: Ermittlung der D7-Nachweisgrenze im Western Blot. Es wurden zwei Proteingele mit einer seriellen 1:10 Verdünnung des rekombinanten D7-Proteins beladen und im Western Blot mit zwei verschiedenen Konzentrationen des anti-D7-IgY-Antikörpers inkubiert. Der Antikörper wurde (A) 1:200 und (B) 1:2000 eingesetzt. Spur 1: 10-170 kDa Proteinmarker; Spur 2: 500 ng; Spur 3: 50 ng; Spur 4: 5 ng; Spur 5: 0,5 ng; Spur 6: 0,05 ng; Spur 7: 0,005 ng; Die Bindung des IgY-Antikörpers wurde mit dem alkalische Phosphatase konjugierten Donkey-anti-chicken IgY (IgG)-Antikörper und anschließender Enzymreaktion mit BCIP/NBT nachgewiesen.

Das virale A27-Protein konnte im Western Blot mit dem monoklonalen Maus-Antikörper (1:500 Verdünnung) sowohl in Calpoxvirus-infizierten 293-Zellen als auch in Virusstocks von Calpoxvirus und VACV-LE detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dadurch, dass der Antikörper im Western Blot in einer niedrigeren Verdünnung als im IFT eingesetzt werden musste, scheint der Western Blot eine geringere Sensitivität als der IFT aufzuweisen. Dies kann auf die Menge an transferiertem Protein auf die Nitrozellulosemembran oder auf die höhere Reaktivität der Antikörper gegen nicht denaturierte Proteine zurückzuführen sein.

Mit Hilfe der beiden Antikörper sollte die Inhibition der *D7R*- bzw. *A27L*-Genexpression durch RNAi auf Proteinebene nachgewiesen werden. In einem Vorversuch wurde deshalb überprüft, ab welchem Zeitpunkt nach der Infektion, die viralen Proteine in den Zellen

nachweisbar sind. Humane 293-Zellen wurden mit Calpoxvirus infiziert, die Proteine 0, 3, 9, 24 und 48 Stunden p. i. geerntet und im Western Blot analysiert. Erst 24 Stunden p. i. konnte eine schwache und nach 48 Stunden eine starke A27-Expression nachgewiesen werden (Abb. 14). Daher kann die Proteinexpression und deren Hemmung durch RNAi erst 24 Stunden p. i. untersucht werden. Auch in diesen Untersuchungen gelang es nicht das D7-Protein nachzuweisen, so dass die folgenden Untersuchungen zur Proteinexpression nach Inhibition durch siRNA nur für das A27-Protein durchgeführt werden konnten.

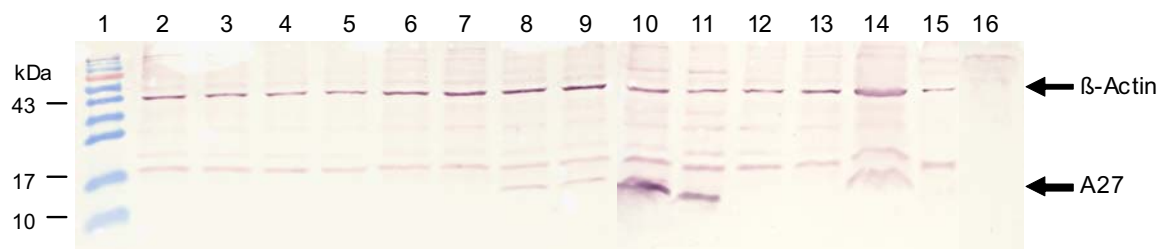


Abb. 14: Expressionskinetik von A27. Humane 293-Zellen wurden mit Calpoxvirus infiziert und die Expression von A27 (14 kDa) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion untersucht. Spur 1: 10-170 kDa Proteinmarker; Untersuchungszeitpunkte p. i. (h): Spur 2-3: t0; Spur 4-5: t3; Spur 6-7: t9; Spur 8-9: t24; Spur 10-11: t48; Spur 12-13: nicht infizierte 293-Zellen, t9; Spur 14: Positivkontrolle für A27 und β -Actin; Spur 15: Virusstock ($1,1 \times 10^5$ PFU); Spur 16: Infektionsdosis (187 PFU). Zur Überprüfung der Proteinaufarbeitung und als Ladekontrolle für den Western Blot wurde die Expression des „housekeeping“-Gens β -Actin (42 kDa) untersucht.

3.4 Etablierung eines siRNA-Systems zur Inhibition der OPV-Replikation

3.4.1 RNAi durch ShortCut siRNA

3.4.1.1 Synthese von ShortCut siRNA

Es gibt verschiedene Möglichkeiten ShortCut siRNA herzustellen. In dieser Arbeit wurde ein Teil des Zielgens, dessen Expression mit siRNA inhibiert werden sollte, in den pCR®II-TOPO®-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) kloniert und anschließend linearisiert (Abb. 15A). Da der Vektor sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des Inserts über einen Promotor verfügt, konnte von beiden Strängen einzelsträngige RNA (ssRNA) synthetisiert werden. Nach der Ausbildung von Doppelstrang-RNA (dsRNA) wurde diese durch die RNaseIII zu kurzen dsRNA-Molekülen verdaut, so dass eine Mischung von siRNAs gegen das Zielgen vorlag. Generell erwies sich die Synthese von dsRNA als problematisch, da nach der dsRNA-Synthese mehr ssRNA als dsRNA in Lösung vorlag. Für die Optimierung

der dsRNA-Synthese wurden verschiedene Temperaturprofile ausgetestet. Erst mit der Verwendung des 2 x Annealing-Puffers und der Inkubation der RNA für 1 Minute bei 90°C und 1 h bei 37°C [90] konnte das dsRNA/ssRNA-Verhältnis verbessert werden. Um den Syntheseschritt zur dsRNA zu umgehen, wurde ein Teil des Zielgens mit spezifischen Primern amplifiziert, welche an ihrem 5'-Ende über die T7-Promotorsequenz verfügten (Abb. 15B). Dadurch wurde noch während der *in vitro* Transkription von beiden DNA-Strängen ssRNA definierter Länge gebildet, die sich noch innerhalb der Reaktion zur dsRNA formierte. Die dsRNA wurde anschließend mit RNaseIII zu einer heterogenen Mischung von siRNA-Molekülen verdaut.

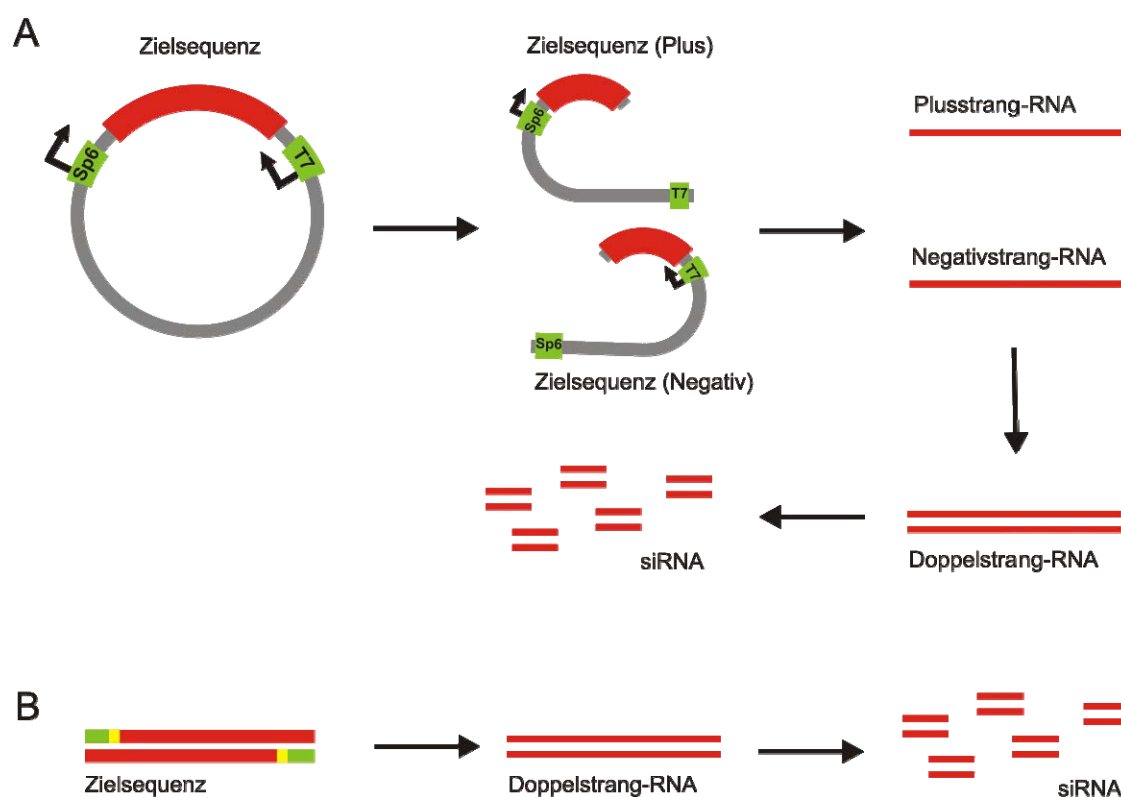


Abb. 15: *In vitro* Synthese von ShortCut siRNA. (A) Die Zielsequenz wurde amplifiziert und in einen Vektor kloniert. Dieser wurde linearisiert, damit bei der *in vitro* Transkription zwei Einzelstrang-RNAs mit der Zielsequenz und begrenzter Länge entstehen. Aus den Einzelstrang-RNAs wurden Doppelstrang-RNAs hergestellt, welche mit RNaseIII verdaut wurden. Dadurch entstanden kurze doppelsträngige siRNA-Moleküle. (B) Ein definierter Genabschnitt wurde mit spezifischen Primern (gelb), die an ihrem 5'-Ende über die T7-Promotorsequenz (grün) verfügten, amplifiziert und *in vitro* transkribiert. Während der *in vitro* Transkription kam es zur Ausbildung von Doppelstrang-RNA, die mit RNaseIII zu siRNAs verdaut wurde. Bei beiden Methoden lag am Ende eine heterogene Mischung von siRNAs gegen die Zielsequenz vor.

3.4.1.2 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Um die Expression von OPV-Genen zu inhibieren, mussten die Zellen nicht nur mit siRNA transfiziert, sondern auch mit Virus infiziert werden. Für die Inhibierungsversuche wurde die

humane HEp-2-Zelllinie ausgewählt. Bei der Optimierung wurde zunächst eine Zellzahl von 5×10^4 HEp-2-Zellen in einer 24-Loch-Platte ermittelt, mit welcher die vom Hersteller empfohlene Konfluenz von 80% erzielt wurde. Anschließend wurde mit einer fluoreszierenden siRNA das Verhältnis von siRNA zu Transfektionsreagenz (1:3) bestimmt, bei dem die meisten Zellen transfiziert wurden. Unter diesen Bedingungen wurde eine siRNA-Konzentrationskinetik von 150 bis 250 nM durchgeführt. Dazu wurden eine kommerzielle siRNA (Qiagen GmbH, Hilden, DE) sowie eine selbst hergestellte ShortCut siRNA-Mischung gegen das Lamin AC-Gen verwendet. Die Wahl eines zellulären Targets sollte verhindern, dass die Ermittlung der optimalen Wirkkonzentration von der Infektion beeinflusst wird. Mit beiden siRNAs wurde mit 200 nM die größte Hemmung der Lamin AC-Expression erzielt, weshalb diese Konzentration in die weiteren Versuche eingesetzt wurde. Transfiziert man HEp-2-Zellen mit 200 nM der fluoreszierenden siRNA, so waren 24 Stunden nach der Transfektion ca. 50% der Zellen transfiziert.

3.4.1.3 Inhibition der OPV-Gene *D7R* und *A56R* von VACV-LE

Humane HEp-2-Zellen wurden mit ShortCut siRNA gegen die OPV-Gene *D7R* und *A56R* transfiziert. Alle Transfektionen wurden in Einfachansätzen durchgeführt, da die ShortCut siRNA nur in begrenzten Mengen hergestellt werden konnte. Sowohl 4 als auch 8 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit VACV-LE infiziert. Jeweils 24 und 48 Stunden p. i. wurde die Kopienzahl der OPV-mRNA sowie der infektiöse Virustiter bestimmt. Die Inhibition der untersuchten Gene war in den Kulturen, die 8 Stunden nach der Transfektion infiziert wurden größer als in denen, die nach 4 Stunden infiziert worden waren. Dies kann daran liegen, dass nach 4 Stunden noch nicht so viele Zellen mit siRNA transfiziert waren und eine längere Exposition der Zellen mit dem Transfektionsansatz notwendig ist. In Abb. 16 sind nur die Ergebnisse der Infektion der Zellen 8 Stunden nach der Transfektion gezeigt. Der siRNA-Cocktail gegen *D7R* führte 24 und 48 Stunden p. i. im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion des *D7R*-mRNA-Levels auf 18% bzw. 26%. Gleichzeitig konnte eine Erniedrigung des infektiösen Virustiters auf 37% und 12% gemessen werden. Das bedeutet, dass *D7R* für die Replikation von VACV-LE benötigt wird. Dahingegen war die Inhibition der *A56R*-mRNA-Expression nicht so effizient wie sie für *D7R* beobachtet wurde. Hier betrug die Kopienzahl der *A56R*-mRNA 24 Stunden p. i. im Vergleich zur Kontrolle noch 52% und nach 48 Stunden war sie auf 35% reduziert. Der Titer des zellfreien Virus war mit 75% und 88% im Vergleich zur Kontrolle wenig reduziert. Unklar ist, ob eine

stärkere *A56R*-Inhibition auch eine stärkere Reduktion des Titers zur Folge gehabt hätte. Da die Reduktion für *A56R* im Titer sehr gering war und hier nur Einfachansätze durchgeführt wurden, kann die Rolle von *A56R* im Hinblick auf die Virusreplikation zum jetzigen Zeitpunkt nicht eingeschätzt werden und sollte in zusätzlichen Experimenten weiter untersucht werden.

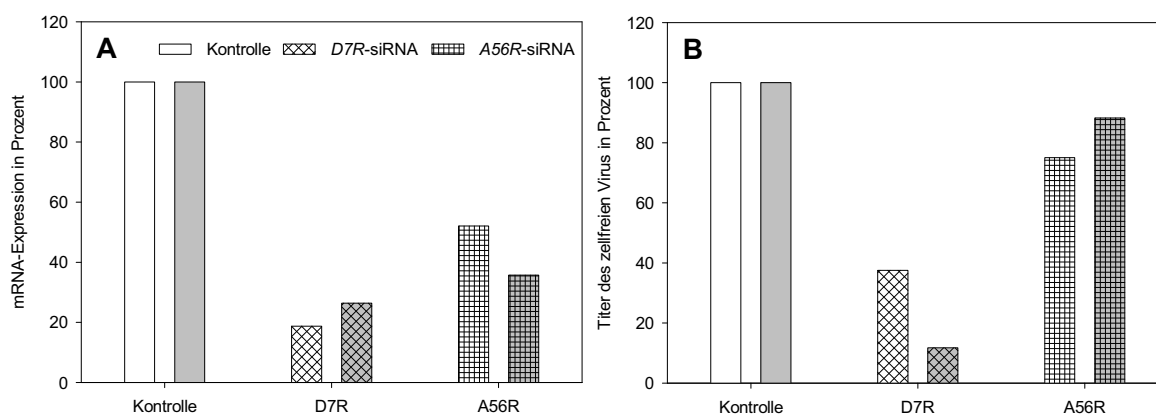


Abb. 16: mRNA-Expression und Virustiter von VACV-LE. HEp-2-Zellen wurden mit einer heterogenen ShortCut siRNA-Mischung gegen die OPV-Gene *D7R* bzw. *A56R* transfiziert, mit VACV-LE infiziert und die (A) *D7R*- und *A56R*-mRNA-Expression sowie (B) der infektiöse Virustiter im Vergleich zu den infizierten Kontrollzellen (100%) 24 und 48 Stunden p. i. untersucht. Der linke Balken entspricht dem 24 und der rechte Balken dem 48 Stundenwert. Die Kontrollzellen wurden vor der Infektion mit einer irrelevanten „non-silencing“ siRNA transfiziert.

Generell konnte mit der ShortCut siRNA die OPV-Genexpression inhibiert werden. Es war jedoch nicht gelungen, ausreichende Mengen an ShortCut siRNA herzustellen, um beliebig viele Untersuchungen durchführen zu können. Deshalb wurde ein weiteres siRNA-System etabliert, bei welchem die siRNA-Ausbeute nicht den limitierenden Faktor darstellt.

3.4.2 RNAi durch short hairpin RNA (shRNA)

3.4.2.1 Herstellung von shRNA-Expressionsplasmiden

Die shRNA ist eine siRNA, die von einer Vektor-kodierten Expressionskassette exprimiert wird (Abb. 17A). Dazu werden Zellen mit dem Vektor transfiziert und *in vitro* wird unter der Kontrolle eines U6-Promotors ein RNA-Transkript synthetisiert, das aus der siRNA-Zielsequenz, einer Haarnadelsequenz, der revers-komplementären siRNA-Zielsequenz und einer Terminations-Sequenz besteht. Die komplementären Sequenzen binden aneinander und sind durch die Haarnadelstruktur miteinander verbunden (Abb. 17B). Dieser Komplex wird als shRNA bezeichnet.

Bei dieser Methode befindet sich nur eine shRNA-Spezies in der Zelle, die das Zielgen sequenzspezifisch inhibiert. Deshalb wird empfohlen, drei bis sechs verschiedene shRNA-Sequenzen auszutesten, um eine möglichst optimale Inhibition des Zielgens zu erreichen. Da die Inhibition verschiedener OPV untersucht werden sollte, wurden die shRNA-Sequenzen möglichst aus konservierten Bereichen der OPV-Genome ausgewählt. Dazu wurde für jedes Zielgen ein Nukleotid-Alignment mit Sequenzen der OPV VACV-COP (M35027), VACV-WR (AY243312), VACV-LIS (AY678276), VACV-ANK (U94848), VACV-MVA-Acam-3000 (AY603355), VACV-MVA-BN (DQ983238), CPXV-BR (AF482758), CPXV-GRI (X94355), CMLV-M-96 (AF438165), ECTV-MOS (AF012825), MPXV-USA-2003 (DQ011157), MPXV-ZAI-1979 (DQ011155), VARV-GAR (Y16780) sowie VARV-BSH (DQ437581) erstellt. Unter Berücksichtigung der Kriterien zum siRNA-Design nach Sayda Elbashir [90] sowie der Anforderungen an das verwendete Vektorsystem (2.11.2), wurden in konservierten Bereichen jedes Zielgens drei verschiedene shRNA-Sequenzen ausgewählt und im Blast-search (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) auf ihre Spezifität überprüft. Nur von shRNA-Sequenzen, die ausschließlich gegen das zu untersuchende Gen von OPV gerichtet waren, wurden Oligonukleotide synthetisiert und nach Anleitung des Herstellers in den psiSTRIKE™hMGFP-Vektor kloniert (2.11.2). Von allen shRNA-Expressionsplasmiden wurden die shRNA-Sequenzen durch Sequenzierung überprüft und erst dann in Inhibierungsversuche eingesetzt.

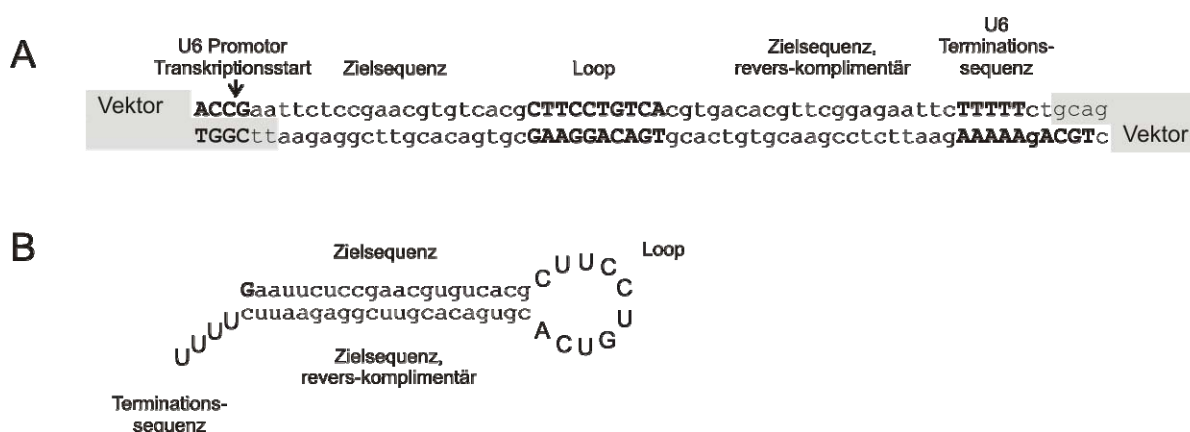


Abb. 17: Aufbau einer shRNA-Expressionskassette am Beispiel der Kontroll-shRNA AB01. (A) Die shRNA-Expressionskassette ist auf einem Vektor kodiert und besteht aus einem U6-Promotor, der siRNA-Zielsequenz, einer Haarnadelsequenz (Loop), der revers-komplementären siRNA-Zielsequenz sowie einer U6-Terminations-Sequenz. (B) Unter der Kontrolle des U6-Promotors wird ein RNA-Transkript synthetisiert, das mit dem Guanotin des U6-Promotors beginnt. Dieses Nukleotid ist nicht nur der Transkriptionsstart des U6-Promotors sondern auch das erste Nukleotid der shRNA. Das RNA-Transkript endet mit der U6-Terminationssequenz, welche den 3'-Überhang der siRNA bildet. Durch die Bindung der komplementären Sequenzbereiche geht die short hairpin RNA (shRNA) hervor.

3.4.2.2 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Um die Ergebnisse aus den Inhibierungsversuchen mit der ShortCut siRNA und der shRNA besser miteinander vergleichen zu können, sollten für die Transfektion mit shRNA-Expressionsplasmiden ebenfalls HEp-2-Zellen verwendet werden. Die shRNA wird durch das Insert auf dem Vektor kodiert, so dass die Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert und die Transfektionsbedingungen neu etabliert werden mussten. Der psiSTRIKE™hMGFP-Vektor kodiert nicht nur für die shRNA, sondern auch für das grün fluoreszierende Protein (GFP), das zusammen mit der shRNA in allen transfizierten Zellen exprimiert wurde. Über die Expression von GFP konnte dadurch das Verhältnis der shRNA-transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in jedem Transfektionsansatz ermittelt werden. Es wurden vier verschiedene Transfektionsreagenzien ausgetestet und jeweils die Zellzahl, die DNA-Menge sowie das Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz eingestellt, um eine hohe Transfektionseffizienz zu erzielen. Mit den Reagenzien Effectene (Qiagen GmbH, Hilden, DE) und Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) wurden mit einer Effizienz von ca. 30% die meisten Zellen transfiziert. Da für die Inhibition der OPV-Genexpression mit RNAi, die transfizierten Zellen anschließend infiziert werden müssen, sollte mindestens die Hälfte der Zellen transfiziert sein, damit statistisch signifikant transfizierte Zellen infiziert werden. Um eine höhere Transfektionseffizienz als in HEp-2-Zellen zu erzielen, wurde die Transfektionseffizienz in 293-Zellen ermittelt, von denen bekannt ist, dass sie gut transfizierbar sind. Die Transfektionsbedingungen wurden dazu erneut mit drei verschiedenen Transfektionsreagenzien sowie der Nucleofactor-Technology von Amaxa (Köln, DE) evaluiert. Mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 wurde sowohl in der 24-Loch- als auch in der 6-Loch-Platte mit ca. 50% die höchste Transfektionsrate erzielt. Unter den optimierten Versuchsbedingungen (2.8.2) wurden alle shRNA-Inhibierungsversuche durchgeführt. Für die Infektion der transfizierten 293-Zellen wurde das pathogene Calpoxvirus verwendet.

3.4.2.3 Inhibition der OPV-Gene *D7R* und *A56R* von Calpoxvirus

Die Expression der OPV-Gene *D7R* und *A56R* konnte mit ShortCut siRNA inhibiert werden (3.4.1.3). Zur Bestätigung der Ergebnisse sollte untersucht werden, ob diese Gene auch durch shRNA inhibiert werden, wobei die mRNA-Expression und der infektiöse Virustiter hier nur 24 Stunden p. i. untersucht wurden. In diesen Inhibierungsversuchen wurden 293-Zellen in separaten Ansätzen mit jeweils drei verschiedenen shRNAs gegen *D7R* sowie

A56R transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit Calpoxvirus infiziert. Die *D7R*-mRNA-Expression wurde durch zwei (AB02 und AB03, Tab. 6) der drei untersuchten shRNAs um mehr als 60% inhibiert (Abb. 18). Bei diesen shRNAs führte die Inhibition in der Transkription auch zu einer Reduktion des infektiösen Virustiters um 84% bzw. 74%. Durch die AB04-shRNA wurde die *D7R*-Expression um 31% und der Virustiter um 30% reduziert. Nur die AB02- und AB03-shRNAs eignen sich folglich für eine effektive Inhibition der *D7R*-Expression. Bei allen drei shRNAs korrelierte das Ausmaß in der *D7R*-Inhibition mit der Reduktion des infektiösen Virustiters, d.h., bei einer starken *D7R*-Inhibition konnte auch eine starke Reduktion des Titers beobachtet werden. Wie auch in den Inhibierungsversuchen mit ShortCut siRNA gezeigt werden konnte, führt die Inhibition der *D7R*-Genexpression gleichzeitig zur Erniedrigung des infektiösen Virustiters. Deshalb scheint *D7R* essentiell für die effiziente Virusreplikation von Calpoxvirus zu sein.

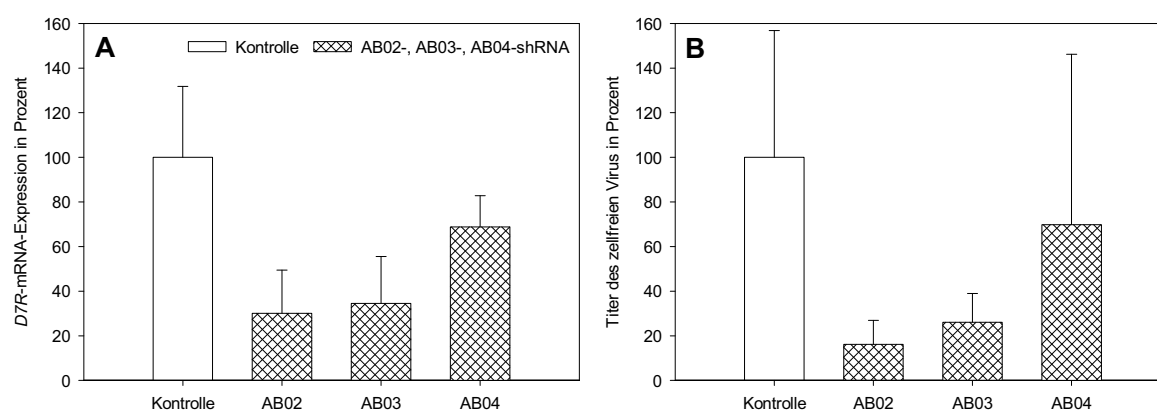


Abb. 18: *D7R*-mRNA-Expression und Virustiter von Calpoxvirus. Humane 293-Zellen wurden mit drei verschiedenen shRNAs (Tab. 6) gegen *D7R* transfiziert, mit Calpoxvirus infiziert und (A) die *D7R*-mRNA-Expression sowie (B) der Virustiter 24 Stunden p. i. untersucht. Gezeigt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachansätzen.

Um die *A56R*-Expression durch RNAi zu inhibieren, wurden drei verschiedene shRNAs ausgetestet (Abb. 19). Dabei wurde die Transkription durch die AB05-shRNA um 52% inhibiert und der infektiöse Virustiter um 40% reduziert. Durch die AB06- und AB07-shRNAs (Tab. 6) wurde die *A56R*-Expression mit 11% und 21% kaum inhibiert. Dennoch wurde für die AB07-shRNA eine Hemmung der Virusproduktion um 55% nachgewiesen. Da nicht nur drei verschiedene shRNAs getestet wurden, sondern auch mit der ShortCut siRNA die *A56R*-Transkription nur um ca. 50% reduziert werden konnte, ist anzunehmen, dass *A56R* nur begrenzt für eine Inhibition mit siRNA geeignet ist. Eventuell verhindern Rückfaltungen der *A56R*-mRNA, dass die siRNA an diese Binden kann. Mit beiden siRNA-

Systemen konnte eine Inhibition der *A56R*-Transkription hervorgerufen werden. Die Auswirkung auf die Virusreplikation war in der Regel nicht signifikant, so dass auf der Grundlage dieser Ergebnisse *A56R* keine entscheidende Rolle in der Virusreplikation spielt.

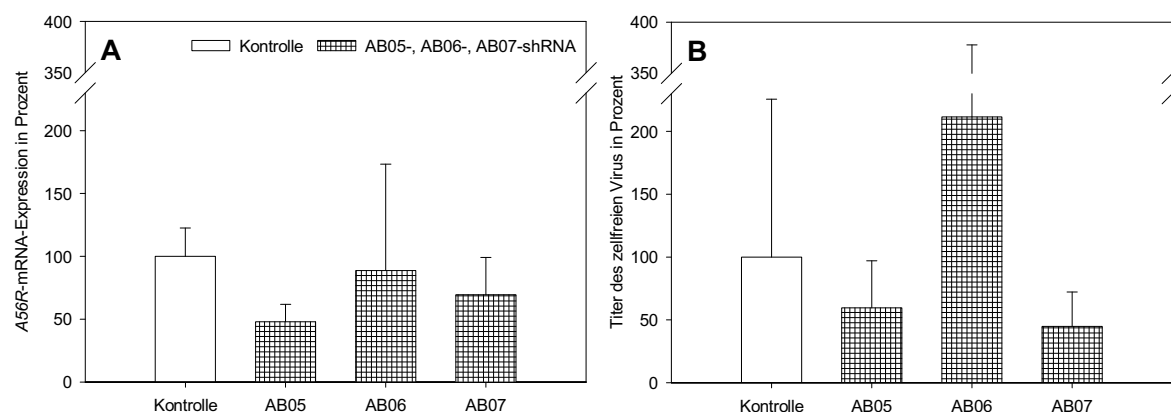


Abb. 19: *A56R*-mRNA-Expression und Virustiter von Calpoxvirus. Humane 293-Zellen wurden mit drei verschiedenen shRNAs (Tab. 6) gegen *A56R* transfiziert, mit Calpoxvirus infiziert und (A) die *A56R*-mRNA-Expression sowie (B) der Virustiter 24 Stunden p. i. untersucht. Gezeigt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachansätzen.

Die OPV-Transkription von *D7R* und *A56R* konnte mit Hilfe der short hairpin RNA inhibiert werden. Im Vergleich zu dem ShortCut siRNA-System konnten die Plasmide, welche die shRNA tragen, in sehr kurzer Zeit hergestellt und vervielfältigt werden, so dass ausreichend Material für eine Transfektion zur Verfügung stand. Da der Vektor nur jeweils eine shRNA exprimiert, konnte ermittelt werden, welche shRNA-Sequenzen sich für die Inhibition der Transkription eignen. Der Vektor kodiert zusätzlich für eine GFP-Expressionskassette, dadurch konnte die Transfektionseffizienz in jedem Transfektionsansatz unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Diese betrug in der Regel zwischen 40 und 50%. Dadurch, dass bei den Inhibierungsversuchen nicht nur die Zellen infiziert wurden, die auch transfiziert waren, waren die ermittelten Werte für die mRNA-Expression oder den Virustiter Schwankungen unterlegen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass dieses System als Screening-Methode eingesetzt werden kann, um auch weitere OPV-Gene zu untersuchen.

3.4.2.4 Inhibition von *A27L*, *D8L* und *K4L*

Um den Einfluss der OPV-Gene *A27L*, *D8L* und *K4L* auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden die Experimente analog zu den *D7R*- und *A56R*-shRNA-Inhibierungsversuchen durchgeführt und die mRNA-Expression sowie der infektiöse Virustiter 24 und 48 Stunden p. i. bestimmt (Abb. 20). Die *A27L*-Transkription wurde 24 und 48 Stunden p. i.

durch zwei (AB08 und AB09, Tab. 6) der drei untersuchten shRNAs um mehr als 80% bzw. 60% reduziert. Bei der AB08-shRNA führte die Inhibition zu einer Abnahme des infektiösen Virustiters um 33% nach 24 Stunden und 90% nach 48 Stunden im Vergleich zu den Kontrollzellen. Durch die AB09-shRNA konnte 24 Stunden p. i. keine Verringerung der Virusproduktion und nach 48 Stunden nur eine Reduktion um 16% gemessen werden. Die AB10-shRNA hat von den untersuchten shRNAs die Transkription am wenigsten beeinflusst. Eine Reduktion in der mRNA-Expression sowie in der Virusproduktion konnte hier nur 24 Stunden p. i. gezeigt werden. In der Regel war die Inhibition der *A27L*-Transkription mit einer Reduktion im Virustiter assoziiert. Dabei zeigte die AB08-shRNA jeweils die stärkste Inhibition und sollte demzufolge für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Um die *D8L*-Transkription zu inhibieren, wurden ebenfalls drei shRNAs getestet (Tab. 6). Die AB11-shRNA inhibierte die Transkription um 63% bis 75% und führte nach 24 und 48 Stunden ebenso zu einer Abnahme des Virustiters auf 40% bzw. 18% des Kontrollwertes (Abb. 20). Eine Inhibition der *D8L*-Transkription durch die AB12- und AB13-shRNAs konnte nur 48 Stunden p. i. nachgewiesen werden. Diese Inhibition resultierte auch in einer Abnahme des Virustiters um 47% bzw. 60%. Von den untersuchten shRNAs eignet sich folglich nur die AB11-shRNA für eine effektive Inhibition der *D8L*-Expression. Bei allen shRNAs hatte jedoch eine Inhibition der *D8L*-Genexpression eine Erniedrigung des Virustiters zur Folge, so dass *D8L* einen Einfluss auf die Virusreplikation von Calpoxvirus hat.

Die Transkription von *K4L* wurde durch die AB14-shRNA (Tab. 6) 24 und 48 Stunden p. i. um 88% und 85% reduziert (Abb. 20). Infektiöses Virus konnte 24 Stunden p. i. nicht nachgewiesen werden, nach 48 Stunden war der Titer um 58% niedriger als in der Kontrolle. Durch die AB15-shRNA wurde die *K4L*-Expression um 56% (24 Stunden p. i.) bzw. 37% (48 Stunden p. i.) reduziert. Dies hatte keinen Einfluss auf die Virusreplikation, da der Virustiter im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert wurde. Die *K4L*-Transkription wurde durch die AB16-shRNA nicht gehemmt und es wurde auch keine Erniedrigung im Virustiter gemessen. Vielmehr war der Titer nach 48 Stunden erhöht. Inwieweit diese Ergebnisse reproduzierbar sind, sollte in weiteren Versuchen überprüft werden. Dadurch, dass bei der Transfektion mit der AB14-shRNA eine starke Inhibition der *K4L*-Transkription eine starke Hemmung der Virusproduktion zur Folge hatte, scheint *K4L* wichtig für die Bildung von

infektiösem Virus zu sein. Für weiterführende Untersuchungen sollte die AB14-shRNA verwendet werden.

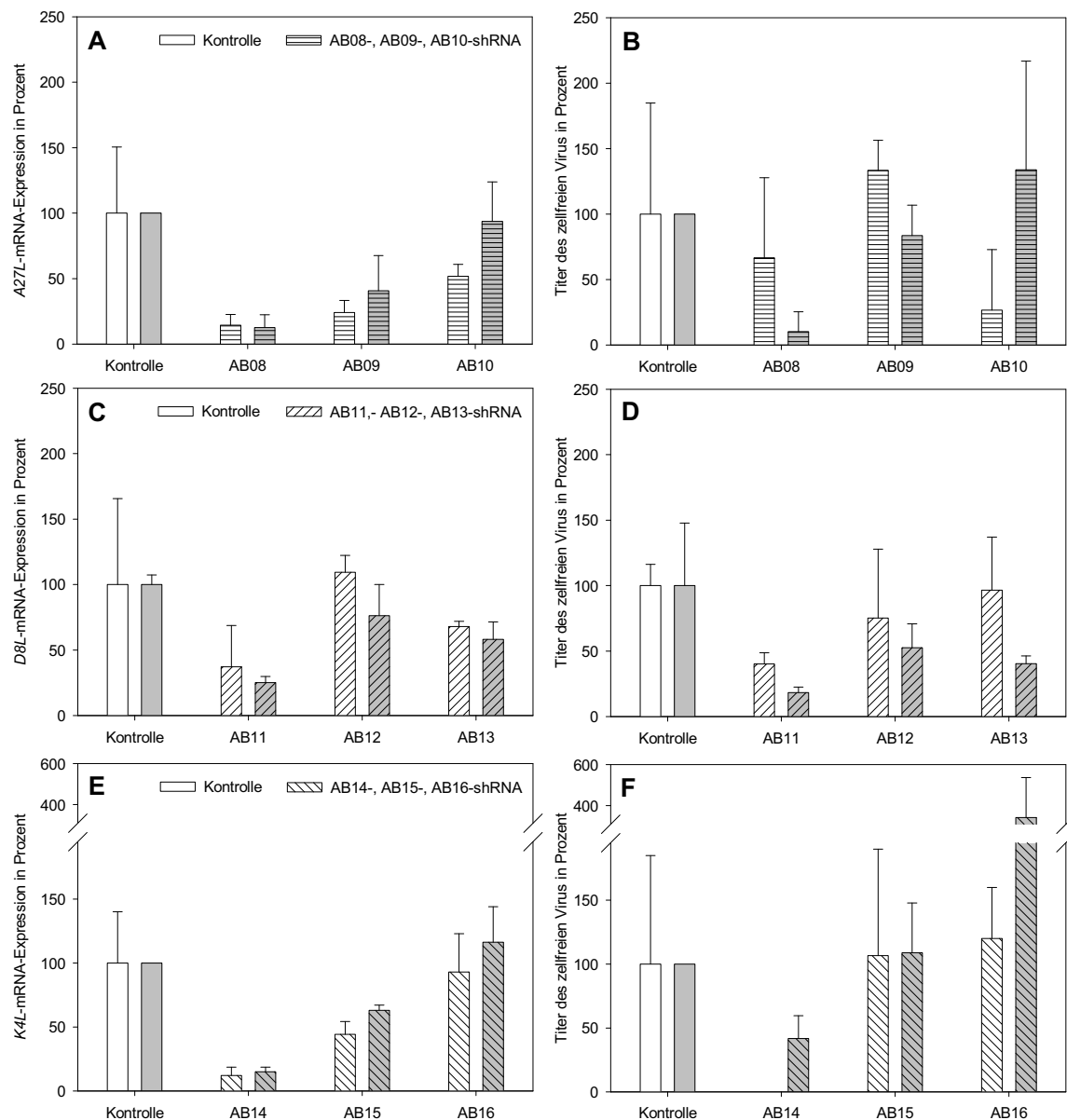


Abb. 20: mRNA-Expression und Virustiter von Calpoxvirus. 293-Zellen wurden mit drei verschiedenen shRNAs (Tab. 6) gegen die OPV-Gene *A27L* (A, B), *D8L* (C, D) und *K4L* (E, F) transfiziert, mit Calpoxvirus infiziert und die jeweilige mRNA-Expression sowie der Virustiter 24 (linker Balken) und 48 (rechter Balken) Stunden p. i. untersucht. Gezeigt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von Dreifachansätzen. Die Kontrolle t_{48h} der *A27L*- und *K4L*-Inhibierungsversuche repräsentiert einen Einfachwert.

Insgesamt wurde ein siRNA-System etabliert, mit welchem die Transkription von OPV-Genen inhibiert werden konnte. Gleichzeitig konnten mit dieser Methode Gene identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Virusvermehrung bzw. Bildung von infektiösem Virus haben. Mit Ausnahme für *A56R* wurde für alle untersuchten Gene gezeigt, dass eine Inhibition der Transkription zu einer Abnahme der Virusproduktion führt. Weiterführend

sollte für all diese Gene nachgewiesen werden, dass die Inhibition der Transkription auch einen Einfluss auf die Synthese der jeweiligen Proteine hat. Denn nur dadurch kann nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der Transkription zu einer Abnahme der entsprechenden Proteine führt. Da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass für das A27-Protein ein Antikörper mit genügender Spezifität zur Verfügung steht, wurden weitere Untersuchungen nur für dieses Gen durchgeführt.

3.5 Inhibition der Replikation von OPV durch RNAi

Mit Hilfe der RNAi wurde gezeigt, dass durch die Inhibition der *A27L*-Transkription die Virusreplikation gehemmt werden kann. Um zu überprüfen, ob die Inhibition der Transkription auch zu einer Reduktion des korrespondierenden Proteins führt, sollte hier zusätzlich zur Virusproduktion die Proteinexpression im Western Blot untersucht werden. Dadurch kann ermittelt werden, ob die Inhibition der *A27L*-Genexpression zu einer Abnahme der Proteinproduktion führt.

3.5.1 Inhibition der Virusreplikation von Calpoxvirus

Humane 293-Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte mit der gegen das *A27L*-Gen gerichteten AB08-shRNA transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit einer MOI von 0,03 mit Calpoxvirus infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer irrelevanten shRNA transfiziert und ebenfalls mit Calpoxvirus infiziert. Um den Einfluss der *A27L*-Inhibition auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden die Zellen 24 und 48 Stunden p. i. analysiert. Zunächst wurde die *A27L*-Genexpression auf Transkriptionsebene untersucht. Diese war 24 Stunden p. i. um 56% und 48 Stunden p. i. um 60% im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. 21A). Um zu überprüfen, ob eine Erniedrigung des *A27L*-mRNA-Levels auch in einer reduzierten Proteinexpression resultiert, wurde diese im Western Blot untersucht (Abb. 21C). Generell konnte das A27-Protein in den Kontrollzellen erst 48 Stunden p. i. nachgewiesen werden. In den AB08-shRNA-transfizierten Zellen wurde das A27-Protein weder 24 noch 48 Stunden p. i. detektiert. Folglich wurde die A27-Expression durch die AB08-shRNA 48 Stunden p. i. so stark reduziert, dass diese unterhalb der Nachweisgrenze im Western Blot lag.

Nachdem gezeigt wurde, dass die *A27L*-Expression durch RNAi inhibiert wurde, sollte die Auswirkung auf die Produktion von infektiösem Virus untersucht werden. A27 ist ein

multifunktionales Protein, das unter anderem den Transport von IMV-Partikeln aus den Virusfabriken vermittelt oder an der Virus-Zell-Fusion und damit an der Virusausbreitung beteiligt ist [108]. Wird von einer OPV-infizierten Zelle weniger A27 gebildet, so ist anzunehmen, dass dies einen Einfluss auf die Bildung oder Freisetzung von Viruspartikeln hat und zum anderen aufgrund der schlechteren Virus-Zell-Fusion im nächsten Replikationszyklus weniger Zellen infiziert werden. Als Maß für die Virusreplikation wurden sowohl die intrazelluläre Virus-DNA als auch der infektiöse Virustiter im Kulturüberstand bestimmt. Die intrazelluläre Virus-DNA war 24 und 48 Stunden p. i. um 69% bzw. 78% reduziert (Abb. 21D). Das heißt, im Vergleich zur Kontrolle wurde weniger neue Virus-DNA gebildet. Dies äußerte sich auch in einer geringeren Transkriptionsrate für andere OPV-Gene wie *D7R* (Abb. 21B), dessen Expression um 60% bis 70% reduziert wurde. Beide Effekte führen zu einer geringeren Produktion und Freisetzung an Nachkommenviren wie es durch die Reduktion des infektiösen Virustiters auf 48% bzw. 20% in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt gezeigt wurde (Abb. 21E). Die Abwesenheit von A27 führt folglich zur Hemmung der Virusreplikation von Calpoxvirus.

3.5.2 Inhibition der Virusreplikation von VACV-LE

Die Inhibition der *A27L*-Genexpression hemmt die Replikation von Calpoxvirus. Um zu zeigen, dass die Inhibition von *A27L* auch bei anderen OPV die Replikation beeinflusst, wurden vergleichbare Versuche mit VACV-LE durchgeführt. Dabei wurde die *A27L*-Transkription 24 und 48 Stunden p. i. um 68% und 60% reduziert (Abb. 22A). Im Western Blot überprüft, ob die Inhibition der *A27L*-Transkription zu einer Reduktion des A27-Proteins führt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte eine Reduktion der Proteinexpression für den 48 Stundenwert bestätigt werden. Die Expression war in den AB08-shRNA-transfizierten Zellen so stark reduziert, dass sie im Western Blot unterhalb der Nachweisgrenze lag. Wie bei den Versuchen mit Calpoxvirus konnte 24 Stunden p. i. noch keine A27-Proteinexpression nachgewiesen und folglich für diesen Zeitpunkt keine Hemmung der Proteinexpression beschrieben werden (Abb. 22C).

Um zu überprüfen, ob wie bei Calpoxvirus die Inhibition von *A27L* zu einer Hemmung der Replikation von VACV-LE führt, wurde die intrazelluläre Virus-DNA und der infektiöse Virustiter im Kulturüberstand untersucht. Die intrazelluläre Virus-DNA war 24 und 48 Stunden p. i. um 60% bzw. 82% reduziert (Abb. 22D). Im Vergleich zur Kontrolle wurde

weniger Virus-DNA produziert. Wenn weniger virale DNA für die Virusreplikation zur Verfügung steht, ist zu erwarten, dass auch die Transkription anderer OPV-Gene im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist. Dies konnte für das *D7R*-Gen bestätigt werden (Abb. 22B). Der infektiöse Virustiter war infolgedessen im Vergleich zur Kontrolle um 35% bzw. 86% reduziert, so dass weniger Nachkommenviren produziert und freigesetzt wurden (Abb. 22E). Dadurch, dass die Virusreplikation bei zwei verschiedenen OPV durch die Inhibition von A27 inhibiert werden konnte, scheint dieses Protein essentiell für die Virusreplikation zu sein und könnte deshalb eine Zielstruktur für die Entwicklung von Therapeutika darstellen.

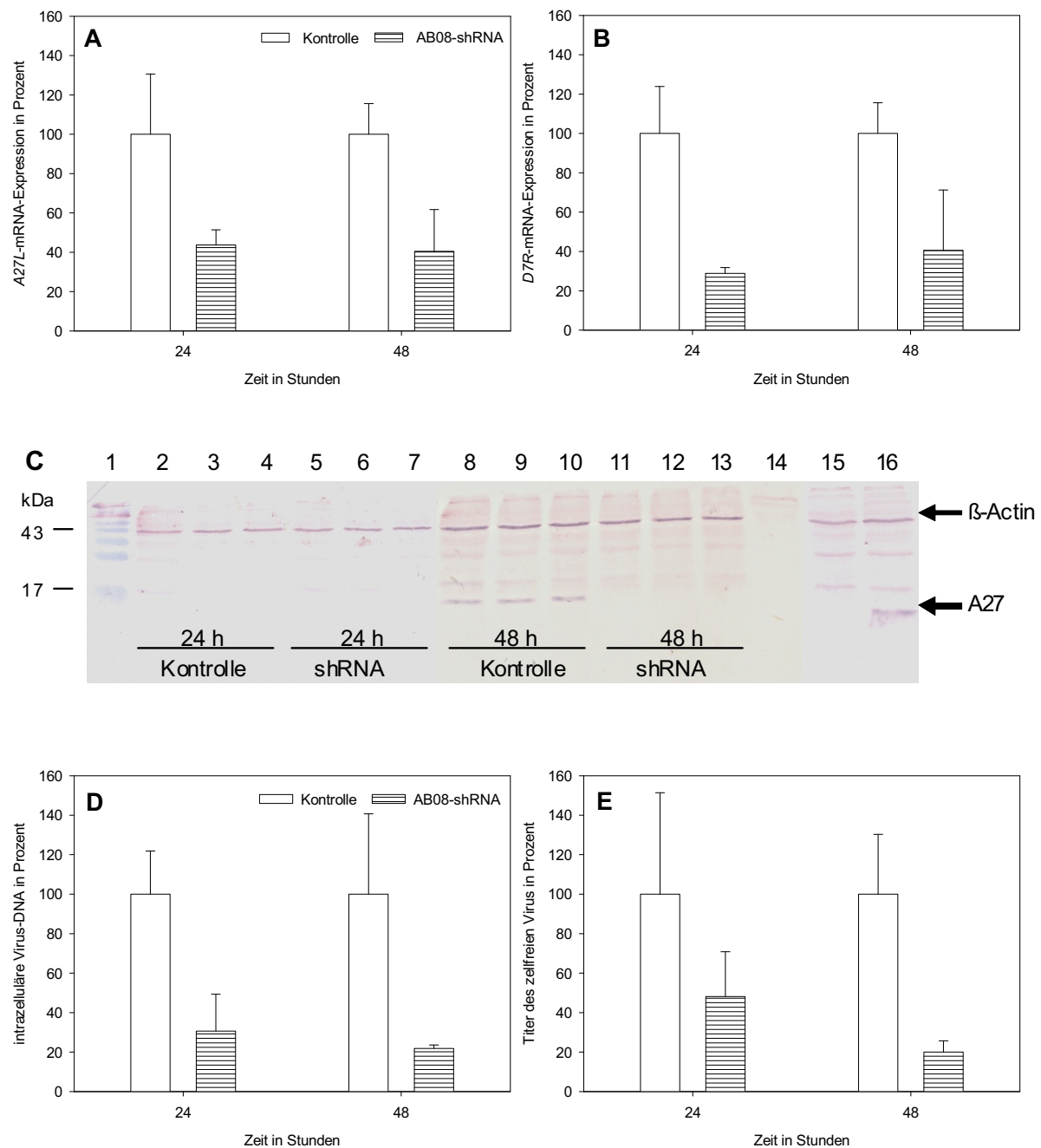


Abb. 21: Reduktion der A27L-Genexpression führt zur Inhibition der Calpoxvirusreplikation. Humane 293-Zellen wurden mit der gegen das A27L-Gen gerichteten AB08-shRNA (Tab. 6) transfiziert, mit Calpoxvirus infiziert und 24 bzw. 48 Stunden p. i. (A) die A27L- und (B) D7R-mRNA-Expression im Vergleich zur mock-transfizierten Kontrolle quantitativ in der real-time PCR analysiert. (C) Gleichzeitig wurde die A27-Proteinexpression im Western Blot untersucht. Zur Überprüfung der Proteinaufarbeitung und als Ladekontrolle für den Western Blot wurde die Expression des „housekeeping“-Gens β -Actin (42 kDa) nachgewiesen. Spur 1: 10-170 kDa Proteinmarker; Spur 2-4: transfiziert, Kontrolle, 24 h; Spur 5-7: transfiziert, AB08-shRNA, 24 h; Spur 8-10: transfiziert, Kontrolle, 48 h; Spur 11-13: transfiziert, AB08-shRNA, 48 h; Spur 14: Infektionsdosis (187 PFU); Spur 15: 293 nicht infiziert; Spur 16: Positivkontrolle für A27 und β -Actin. Die Virusreplikation wurde auf der Grundlage (D) der quantitativen Messung der intrazellulären Virus-DNA im TaqMan und (E) der Titration des infektiösen Virustiters (Plaquetest) untersucht.

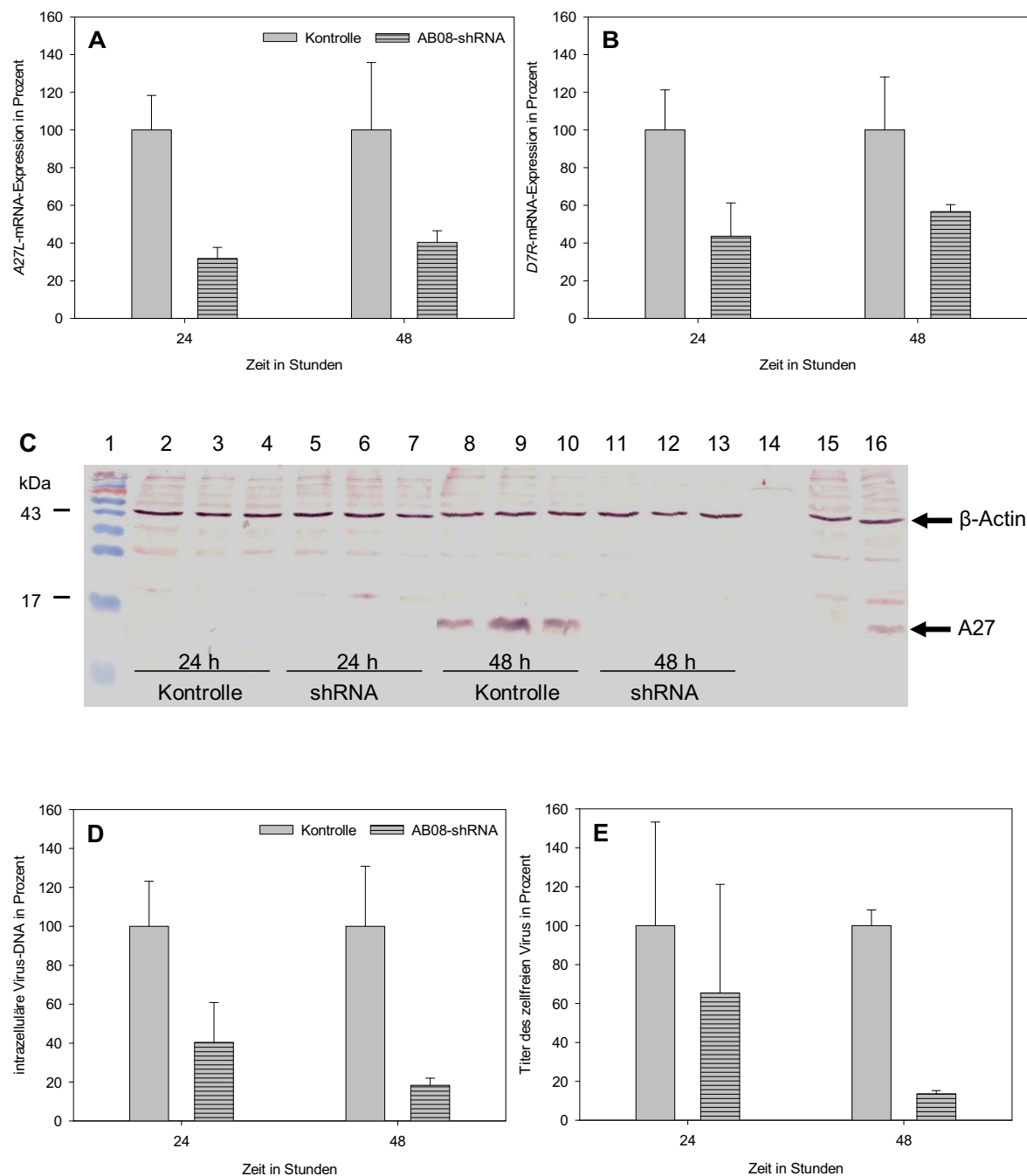


Abb. 22: Reduktion der A27L-Genexpression führt zur Inhibition der Replikation von VACV-LE. Humane 293-Zellen wurden mit der gegen das A27L-Gen gerichteten AB08-shRNA (Tab. 6) transfiziert, mit Calpoxvirus infiziert und 24 bzw. 48 Stunden p. i. (A) die A27L- und (B) D7R-mRNA-Expression im Vergleich zur mock-transfizierten Kontrolle quantitativ in der real-time PCR analysiert. (C) Gleichzeitig wurde die A27-Proteinexpression im Western Blot untersucht. Zur Überprüfung der Proteinaufarbeitung und als Ladekontrolle für den Western Blot wurde die Expression des „housekeeping“-Gens β-Actin (42 kDa) nachgewiesen. Spur 1: 10-170 kDa Proteinmarker; Spur 2-4: transfiziert, Kontrolle, 24 h; Spur 5-7: transfiziert, AB08-shRNA, 24 h; Spur 8-10: transfiziert, Kontrolle, 48 h; Spur 11-13: transfiziert, AB08-shRNA, 48 h; Spur 14: Infektionsdosis (187 PFU); Spur 15: 293 nicht infiziert; Spur 16: Positivkontrolle für A27 und β-Actin. Die Virusreplikation wurde auf der Grundlage (D) der quantitativen Messung der intrazellulären Virus-DNA im TaqMan und (E) der Titration des infektiösen Virustiters (Plaquetest) untersucht.

4 Diskussion

4.1 Regulation der OPV-Replikation

Der Replikationszyklus von OPV ist durch den Viruseintritt, die regulierte Genexpression, die DNA-Replikation, den Zusammenbau und die Verbreitung von Viruspartikeln charakterisiert [109]. Unter optimalen Bedingungen kann bereits nach 4 bis 6 Stunden ein Anstieg des infektiösen Virustiters und nach 24 Stunden ein Maximum von 10.000 Viruspartikeln nachgewiesen werden [110]. Der Zeitpunkt der DNA-Replikation variiert bei den Vertretern der Pockenviren und ist abhängig von der Infektionsdosis (MOI) sowie vom Zelltyp [38]. In dieser Arbeit wurden humane HEp-2-Zellen mit den OPV VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus sowie die humanen Zelllinien HEp-2, 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 mit Calpoxvirus mit einer MOI von 0,3, 0,03 sowie 0,003 infiziert. Unabhängig von der Zelllinie, den untersuchten Viren und der eingesetzten Infektionsdosis erfolgte die DNA-Replikation in allen Systemen 0,5 bis 2 Stunden p. i. Dahingegen wurde bei einem Vertreter des Genus der *Parapockenviren*, dem *Orfvirus* die DNA-Replikation erst ca. 4 bis 6 Stunden p. i. nachgewiesen [111] und bei dem *Geflügel-pockenvirus*, Genus der *Avipockenviren*, nach 12 bis 16 Stunden [112]. In VACV-infizierten Zellen begann die DNA-Replikation nach 1 bis 2 Stunden p. i. und führte zu ca. 10.000 Genomkopien pro Zelle, von welchen die Hälfte sofort in Virionen verpackt wurde [38,113].

VACV und VACV-MVA durchlaufen ihren Replikationszyklus in permissiven Zellen in weniger als 8 Stunden (D. Kalman, unveröffentlichte Ergebnisse aus [114]). Ein ähnlicher Zeitraum wurde für die untersuchten OPV VACV-LE, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus in HEp-2-Zellen ermittelt, bei welchen die Virusreplikation nach ca. 9 Stunden abgeschlossen war. In den humanen Zelllinien 293, A-549, Huh-7 und HSB-2 war der erste Replikationszyklus von Calpoxvirus nach ca. 9 bis 25 Stunden beendet.

Die Virusproduktion von Calpoxvirus variierte zwischen den Zelllinien und war in A-549, Huh-7 und HSB-2 am höchsten. Diese Zellen stammen ursprünglich aus der Lunge, der Leber oder von T-Zellen ab und weisen auch *in vivo* nach intranasaler bzw. intravenöser Infektion von Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) mit Calpoxvirus die höchsten Viruslasten auf [8]. Der attenuierte VACV-Stamm VACV-MVA-BN hat seinen Replikationszyklus in HEp-2-Zellen nicht beendet, da bis zum Versuchsende nach 48 Stunden keine infektiösen Viruspartikel freigesetzt wurden. Auch in anderen Mammalia-Zellen wurde ein unvollständiger Replikationszyklus für VACV-MVA beschrieben

[101,115,116,117], was darauf zurückzuführen ist, dass VACV-MVA mehr als 570 Passagen in CEF-Zellen kultiviert wurde und dabei ca. 30 kb seines Genoms verloren hat [67,118].

Während der Virusreplikation nimmt die kaskadenartige Expression der früh, mittel und spät exprimierten OPV-Gene eine entscheidende Rolle ein [25]. Genprodukte, die für die nächste Phase der Expression oder Virusreplikation benötigt werden, werden jeweils in der vorangegangenen exprimiert [37]. Um festzustellen, welche OPV-Gene eine wichtige Rolle während der Virusreplikation spielen, wurde innerhalb des ersten Replikationszyklus der hier durchgeführten Infektionskinetiken die Transkription von Genen untersucht, deren Genprodukte an der viralen Transkription, der DNA-Replikation, der Virusmorphogenese oder der Immunmodulation beteiligt sind. Die Zeitpunkte der Expression für die untersuchten OPV-Gene waren teilweise schwer zu bestimmen, da für einzelne der untersuchten Gene bereits zu Beginn der Infektionskinetiken virale mRNA nachgewiesen werden konnte. Vorversuche haben gezeigt, dass die untersuchten OPV VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus am Ende ihres Infektionszyklus nicht nur das frühe Transkriptionssystem in den Viruspartikeln [25] sondern auch virale mRNA verpacken. Die RNA-Mengen in den Virusstocks schwankten zwischen 10^2 bis 10^6 Kopien bei CMLV-CP-19, VACV-MVA-BN und VACV-LE und waren bei Calpoxvirus mit 10^8 bis $>10^9$ Kopien am höchsten. Für die Infektionsversuche wurden mit Ausnahme von VACV-MVA-BN alle Viren in HEp-2-Zellen vorgezüchtet, so dass die Menge der in den Viruspartikeln verpackten RNA abhängig vom Virus ist. Die Verpackung der mRNA erfolgt ungerichtet, da sich der Anteil der mRNA in Abhängigkeit des gemessenen Gens bei allen Viren unterschied. In den Infektionskinetiken wurde die mitgebrachte mRNA in der Regel zu Beginn der Infektion abgebaut. Dadurch konnten über die Zunahme der OPV-mRNA der Zeitpunkt der Genexpression bestimmt und Gene identifiziert werden, die unabhängig von den untersuchten Viren oder der verwendeten Zelllinie zu den gleichen Zeitpunkten während der Infektion transkribiert wurden.

Zu diesen Genen gehören unter anderem *D7R*, *G8R* und *K4L*. Das Gen *D7R* kodiert für eine Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase [104,119], welche für die Transkription der frühen, mittleren und späten Gene benötigt wird [25,37] und *G8R* für einen Transkriptionsfaktor zur Expression der späten Gene [33]. Beide Gene sind an der Transkription beteiligt und die jeweilige Genexpression wurde in allen Systemen gleich reguliert, so dass diese Gene als essentiell für die Replikation von OPV angesehen werden

können. Interessanterweise wurde *G8R* in allen Infektionsversuchen >3 Stunden p. i. und damit erst spät während der Infektion exprimiert. Bisher wurde *G8R* als mittleres Gen beschrieben [33]. Neben *G8R* sind vier weitere Transkriptionsfaktoren bekannt, die mit der Expression der späten Gene assoziiert sind [34,35,120,121]. Möglicherweise sind diese Transkriptionsfaktoren an der Expression bestimmter Gene beteiligt oder sie werden für die Transkription in einer bestimmten Abfolge benötigt und dementsprechend zeitlich nacheinander exprimiert. Das *K4L*-Gen kodiert für ein Enzym, das über „Schneide-“ und „Klebe-“Eigenschaften verfügt und am Ende der Virusreplikation mit dem frühen Transkriptionssystem im Virus-Core verpackt wird [40,41,42]. Deshalb wird vermutet, dass *K4L* an der DNA-Replikation beteiligt sein könnte, wenngleich die Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist [106]. Aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Regulation der *K4L*-Expression in allen Infektionsversuchen, kann hier auch für dieses Gen eine bedeutende Rolle im Replikationszyklus vermutet werden.

Die Transkription der untersuchten Oberflächenproteine D8, A27 und A56 wurde in allen Systemen ebenfalls sehr ähnlich reguliert und erfolgte innerhalb der ersten 2 Stunden p. i. Im Allgemeinen werden diese Proteine spät, d.h. >2 Stunden p. i., während der Infektion exprimiert [105,122,123], da sie erst am Ende der Virusmorphogenese für den Zusammenbau der Viruspartikel benötigt werden [12]. Nur von *A56R* ist bekannt, dass dieses Gen von verschiedenen Promotoren früh und spät während der Infektion exprimiert werden kann [124].

Im Gegensatz zu den regulatorischen OPV-Genen oder den Oberflächenproteinen wurden die immunmodulatorischen Gene mit Ausnahme von *E3L* von den untersuchten OPV zu unterschiedlichen Zeiten während der Infektion transkribiert und somit die Expression virusspezifisch reguliert. *E3L* wurde wie in anderen Versuchen beschrieben früh während der Infektion [125] und von allen untersuchten Viren als erstes der immunmodulatorischen Gene exprimiert. Das bedeutet, dass *E3L* bei allen Viren essentiell für die initiale Immunabwehr ist, da es aufgrund seiner Bindung an dsRNA, einen der wichtigsten zellulären Abwehrmechanismen, die Aktivierung der IFN- α und - β induzierten Signalkaskade verhindert [125]. Die Bedeutung dieses Proteins für die effiziente Replikation [126] und Pathogenese [127] wurde für VACV in mehreren Zelllinien beschrieben. Die anderen untersuchten immunmodulatorischen Gene kodieren für lösliche Rezeptoren und können freie Zytokine wie IL-1 β (*B16R*) [54], IL-18 (*C12L*) [56] oder TNF α/β (*B28R*,

A53R oder *crmD*) [59,60] binden. Diese Gene wurden in den Infektionsversuchen nicht von allen untersuchten OPV exprimiert, da diese im Genom teilweise verkürzt, fragmentiert oder vollständig deletiert vorlagen (Tab. 19). Generell werden immunmodulatorische Gene nicht von allen OPV exprimiert, so dass die Pathogenität sowie die Spezifität eines OPV gegenüber dem Wirt von den entwickelten Immunevasionsmechanismen abhängig sind [6]. Das Calpoxvirus hat als einziges der untersuchten OPV alle sechs immunmodulatorischen Gene exprimiert und deren Expression in den humanen Zelllinien gleich reguliert. Dies lässt auf eine hohe Pathogenität schließen wie sie für Calpoxvirus-infizierte Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) bereits gezeigt wurde [8]. Dagegen exprimierte VACV-MVA-BN nur drei der untersuchten immunmodulatorischen Gene, was auf den Verlust des Genoms und die dadurch hervorgegangene attenuierte Pathogenität zurückzuführen ist [67,118].

Unabhängig von der Pathogenität zeigten die untersuchten OPV VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 und Calpoxvirus keine Unterschiede in der Virusreplikation hinsichtlich dem Zeitpunkt der DNA-Replikation oder der Dauer des Replikationszyklus. Dies ist wahrscheinlich auf die Gemeinsamkeiten in der Expression von Genen zurückzuführen, deren Genprodukte unter anderem an der Transkription oder Virusmorphogenese beteiligt sind. Diese Gene wurden ebenso von VACV-MVA-BN zu den gleichen Zeitpunkten exprimiert, obgleich dieses Virus in Hep-2-Zellen keine infektiösen Nachkommenviren produziert hat. *D7R*, *G8R*, *K4L*, *A56R*, *D8L* und *A27L* sind daher bei allen untersuchten OPV als essentielle Gene der Virusreplikation anzusehen.

4.2 Etablierung von siRNA-Transfektionssystemen

Die RNAi ist ein natürlicher Vorgang in Pflanzen und Mammalia-Zellen, bei welchem die Expression eines Gens sequenzspezifisch herunterreguliert wird [83,128]. Inzwischen wird RNAi als gängige Methode verwendet, um die Funktion von Genen zu untersuchen oder Zielgene für Therapieanwendungen zu definieren. So konnte z. B. ShortCut siRNA erfolgreich für die Inhibition der Replikation von Masernviren eingesetzt werden [91]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten RNAi in der Zelle zu induzieren. In dieser Arbeit wurden zwei siRNA-Methoden etabliert, um die Expression von OPV-Genen zu inhibieren. Zudem war der Versuchsaufbau so gewählt, dass der Einfluss dieser Gene auf die virale DNA-Replikation und die Bildung von infektiösen Viren untersucht werden konnte. Die Expression der OPV-Gene *D7R* und *A56R* wurde zunächst in VACV-LE-infizierten Hep-2-Zellen 24 und 48 Stunden p. i. mit ShortCut siRNA inhibiert. Ein Vorteil der ShortCut

siRNA gegenüber anderen synthetisch hergestellten siRNAs ist, dass die Funktion eines Gens sehr schnell untersucht werden kann, da die siRNA-Sequenzen nicht spezifisch ausgewählt und experimentell auf ihre Funktionalität überprüft werden müssen. Es liegt ein Gemisch von verschiedenen gegen das Zielgen-gerichteten siRNA-Molekülen vor, in dem mindestens eine siRNA zum Knockdown des Zielgens führen sollte.

Die Transfektionseffizienz wurde in den Inhibierungsversuchen von *D7R* und *A56R* indirekt über eine fluoreszenzmarkierte scrambled-siRNA (Qiagen GmbH, Hilden, DE) in den Kontrollzellen ermittelt, da die jeweiligen ShortCut siRNAs nicht fluoreszenzmarkiert waren. Die gleiche siRNA wurde zuvor für die Optimierung der Transfektionsbedingungen verwendet und davon ausgegangen, dass sich die anderen siRNA-Moleküle unter diesen Bedingungen ähnlich verhalten würden. Die Transfektionseffizienz betrug in der Regel 50%.

Als kritischer Punkt während der ShortCut siRNA-Synthese erweist sich der vollständige Verdau der langen dsRNA-Fragmente zu den kurzen siRNA-Molekülen. Bei einem unvollständigen dsRNA-Verdau kann die unspezifische Interferonantwort induziert werden [90]. Erfolgt der Verdau unter Enzymüberschuss oder wird die optimale Inkubationszeit überschritten, entstehen Fragmente mit einer Länge von 10 bis 12 bp, die die Größe von siRNA-Molekülen unterschreiten (Instruction Manual ShortCut® RNAi Kit, New England Biolabs Inc., Ipswich, US). Deshalb wurde der dsRNA-Verdau stets in Hinblick auf die entstandenen Fragmentgrößen im Polyacrylamidgel überprüft. Weiterhin konnte trotz Anpassungen im Syntheseprotokoll bei doppelter oder dreifacher Konzentration der Ausgangsreagenzien, nicht proportional mehr ShortCut siRNA hergestellt werden. Dadurch war die Menge an ShortCut siRNA limitiert und die Experimente konnten in dieser Arbeit nur in begrenztem Umfang durchgeführt werden.

Daher wurde ein anderes siRNA-System, die short hairpin RNA (shRNA)-Methode etabliert, bei welcher die siRNA-Menge nicht den limitierenden Faktor darstellt. Die shRNA ist auf einem Vektor kodiert und wird erst nach der Transfektion in der Zelle exprimiert. Die shRNA-Vektoren konnten in *E. coli* vermehrt werden und standen damit in ausreichender Menge für die Untersuchungen zur Verfügung.

Im Gegensatz zur Methode der ShortCut-siRNA, die theoretisch den gesamten zu untersuchenden Genombereich abdeckt, kodiert jeder Vektor nur für eine definierte shRNA-Sequenz. Da jedoch nicht jede shRNA-Sequenz eine Inhibition der Expression des Zielgens

bewirkt [129], wurden für jedes Zielgene drei verschiedene shRNA-Sequenzen auf der Grundlage der Kriterien zum siRNA-Design von Elbashir [90] sowie der Anforderungen an den Vektor ausgewählt und die shRNAs experimentell auf ihre Funktionalität untersucht. Im Vergleich zur ShortCut siRNA wird durch diese Funktionsanalyse mehr Zeit benötigt, um das Zielgen spezifisch zu inhibieren. Doch ist dadurch bekannt, welche shRNA-Sequenz für die weiteren Untersuchungen der Inhibition eingesetzt werden können.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Vektor gleichzeitig auch für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, das zusammen mit der shRNA in der Zelle exprimiert wird. Dadurch konnte in jedem Versuchsansatz über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen die Transfektionsrate der mit shRNA transfizierten Zellen ermittelt werden. Diese betrug bei den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen in der Regel zwischen 40 und 50%.

Mit der shRNA-Methode konnte erfolgreich die Expression der OPV-Gene *D7R* und *A56R* in Calpoxvirus-infizierten 293-Zellen inhibiert werden. Wie bei der ShortCut siRNA-Methode ermöglicht der Versuchsaufbau gleichzeitig den Einfluss von OPV-Genen auf die Virusreplikation zu untersuchen.

Da bei dem Einsatz von shRNA a) keine Limitierung in der siRNA-Menge besteht, b) die Transfektionseffizienz in jedem Versuchsansatz bestimmt werden kann, c) einmalige Synthesekosten anfallen und d) die Sequenz der inhibierenden siRNA bekannt ist, wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem System durchgeführt. Die shRNA-Methode eignet sich nicht nur für die Identifizierung von OPV-Genen, die an der Virusreplikation beteiligt sind, sondern auch für die Analyse von Genfunktionen oder Interaktionsstudien von viralen oder zellulären Genen.

4.3 Identifizierung von potentiellen Zielgenen für eine siRNA-Therapie

In den letzten Jahren wurde die Entwicklung von antiviralen Substanzen zur Behandlung einer Pockenviruserkrankung nicht nur durch das zoonotische Potential pathogener Pockenviren sondern auch durch die potentielle Verwendung von VARV als bioterroristischen Kampfstoff vorangetrieben. Dadurch wurden eine Vielzahl von antiviralen Verbindungen identifiziert, die wie Cidofovir [70,71] oder ST-246 [72] die DNA-Replikation oder die Virusausschleusung inhibieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch RNAi, Gene identifiziert werden können, die wichtig für die Replikation von OPV sind. Für die Untersuchungen wurden Gene ausgewählt, die für Faktoren der DNA-Replikation (*K4L*), der viralen Transkription (*D7R*) oder für Oberflächenproteine (*A56R*, *D8L*, *A27L*) kodieren. Die Auswahl dieser Gene erfolgte auf der Grundlage von Expressionskinetiken in Zellen, die mit VACV-LE, VACV-MVA-BN, CMLV-CP-19 bzw. Calpoxvirus infiziert waren. Es konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Gene gleich reguliert wurden, was Anlass zu der Vermutung gibt, dass diese Gene essentiell für die Virusreplikation sein können. Für jedes dieser Gene wurde die inhibitorische Wirkung von drei verschiedenen shRNAs untersucht, da aus der Literatur bekannt war, dass nicht jede siRNA-Sequenz zu einer Hemmung der Genexpression führt [129]. So inhibierte nur eine (AB14-shRNA) von drei getesteten shRNAs effektiv die *K4L*-Transkription, in dessen Folge die Virusreplikation von Calpoxvirus 24 und 48 Stunden p. i. um ca. 100% bzw. 58% gehemmt wurde.

Die Rolle von *K4L* im Replikationszyklus ist noch weitgehend ungeklärt [106]. Doch wird vermutet, dass dieses Gen aufgrund seiner „Schneide-“ und „Klebe-“ Eigenschaften an der DNA-Replikation beteiligt ist [40,41]. Diese Hypothese kann durch die shRNA-Inhibierungsversuche unterstützt werden, indem durch die Inhibition von *K4L* auch die DNA-Replikation gestört und folglich die Bildung von infektiösen Viren reduziert sein sollte. Diese Untersuchungsergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen, die mit einer VACV-Deletionsmutante des *K4L*-Gens erzielt wurden. Weder in BSC-1-Zellen noch in BALB/c-Mäusen wurde eine Reduktion der intra- oder extrazellulären Virusproduktion im Vergleich zum Wildtypvirus beobachtet, wodurch eine Beteiligung von *K4L* an der DNA-Replikation ausgeschlossen wurde [106,130]. Möglicherweise ist *K4L* nur für die Vermehrung bestimmter Pockenviren essentiell, da dieses Gen z. B. bei VARV fehlt und bei ECTV fragmentiert ist [131]. Das Calpoxvirus zeigt phylogenetisch die größte Verwandtschaft zu den CPXV [8]. Daher ist es möglich, dass *K4L* nur für die Virusreplikation von CPXV essentiell ist. Dies könnte in weiterführenden Versuchen überprüft werden, indem die Expression von *K4L* bei weiteren CPXV-Isolaten und parallel auch bei VACV gehemmt und der Einfluss auf die Virusreplikation untersucht wird. Aus den bisherigen Untersuchungen kann folglich nur geschlossen werden, dass *K4L* ein potentielles Zielgen für die Inhibition von Calpoxvirus und möglicherweise anderen CPXV-Isolaten darstellt.

OPV verfügen über einen eigenen Transkriptionsapparat und können deshalb im Zytoplasma der Zelle replizieren[25]. Das OPV-Gen *D7R* kodiert für eine Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase [104]. Die Transkription dieses Gens konnte durch zwei (AB02- und AB03-shRNA) der drei eingesetzten shRNAs um 70% bzw. 65% herabgesetzt und gleichzeitig die Bildung infektiöser Calpoxviren um 84% bzw. 74% reduziert werden. Die Bedeutung von *D7R* für die OPV-Replikation wurde durch die Inhibition der Expression von *D7R* in VACV-LE-infizierten Zellen durch ShortCut siRNAs unterstützt und bestätigen frühere Untersuchungen [132]. In diesen wurden in den *D7R*-ORF temperatursensitive Mutationen eingefügt, wodurch der Phänotyp dieser Mutanten bei nicht-permissiven Temperaturen in der Expression der späten viralen Proteine defektiv war. Es wurde vermutet, dass in der frühen Phase der Expression keine RNA-Polymerase-Untereinheiten synthetisiert wurden und dadurch die späten Gene nicht transkribiert werden konnten [132]. Weitere Versuche zur Bedeutung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase für die Virusreplikation wurden mit der RNA-Polymerase-Untereinheit RAP94 (*H4L*-Gen) durchgeführt und gezeigt, dass gegen diese Untereinheit gerichtete Antikörper die Transkription von frühen Genen *in vitro* verhindern [133,134,135]. Demnach ist *D7R* ein vielversprechender Kandidat für die Inhibition der Replikation von OPV. Die zentrale Bedeutung des Transkriptionsapparates und der beteiligten regulatorischen Proteine wird durch gegenwärtige Untersuchungen unterstützt, bei welchen die Inhibition des an der DNA-Replikation beteiligten OPV-Gens *D5R* zu einer Abnahme von infektiösen Viruspartikeln bei VACV-WR, CPXV und MPXV führt [136].

Sowohl EEV- als auch IMV-Partikel können durch Antikörper neutralisiert werden [137,138]. In Inhibitionsversuchen sollte untersucht werden, ob die Expression der Oberflächenproteine A56, D8 und A27 durch RNAi inhibiert werden kann und dies zu einer Reduktion des Virustiters in der Zellkultur führt. Inwieweit jedoch aus diesen Versuchen auf die Rolle dieser Proteine bei der *in vivo* Infektion geschlossen werden kann, ist unklar. In verschiedenen anderen Virussystemen, wie z. B. dem Pseudorabiesvirus konnte gezeigt werden, dass einzelne Gene für die Produktion von Glykoproteinen ausgeschaltet werden können, ohne dass die Produktion von infektiösen Viruspartikeln beeinflusst wird. Diese Mutationen führen jedoch zu einer Attenuierung der Viren *in vivo* [139].

Das A56-Protein ist als 85kDa Transmembranglykoprotein ein Bestandteil von EEV-Partikeln [105], dessen Rolle bei der Zell-Zell-Fusion kontrovers diskutiert wird. Einerseits führt die Lokalisation von A56 auf der Zelloberfläche zu einer Inhibition der Zellfusion [140]. Andererseits wurde durch die Insertion des *A56R*-Gens in andere Virusspezies eine Zell-Fusion beobachtet [141,142]. In der Zellkultur vermehrten sich *A56R*-Mutanten vergleichbar zu Wildtypviren [62]. Die Infektion von Mäusen mit *A56R*-Mutanten resultierte jedoch in einer Attenuierung der Viren, da sie sich in verschiedenen Organen weniger effizient vermehrt haben [143]. In dieser Arbeit konnte die *A56R*-Transkription sowohl mit der ShortCut siRNA als auch mit dem getesteten shRNA-Pool um maximal 50% reduziert werden. Jedoch hatte die Inhibition des *A56R*-Gens durch RNAi weder einen Einfluss auf die Virusreplikation von VACV-LE noch von Calpoxvirus. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den oben beschriebenen *in vitro* Untersuchungen der *A56R*-Mutanten. Ob *A56R* prinzipiell einen Einfluss auf die Virusreplikation *in vitro* hat, ließe sich abschließend beurteilen, wenn sich die Transkriptionsrate um mindestens 80% reduzieren lassen würde [83,128,144]. Ursachen für die schlechte Inhibition der Transkription können in der gewählten Zielsequenz liegen, wenngleich die shRNAs gegen verschiedene Genbereiche gerichtet waren [90]. Möglicherweise verhindern Rückfaltungen der mRNA die Bindung der shRNA. Insgesamt sind die Ergebnisse zu *A56R* sehr widersprüchlich und lassen die Frage offen, ob sich dieses Gen als Target für eine therapeutische Anwendung eignet.

D8L kodiert für ein Membranprotein auf der Oberfläche von IMV-Partikeln [18]. Ursprünglich wurde angenommen, dass *D8L* keine Bedeutung für die Virusreplikation in der Zellkultur hat, da die Infektion von *D8L*-Mutanten zur Ausbildung eines normalen Plaquephänotypen führte [145,146]. Die Arbeitsgruppe um Hsiao zeigt, dass D8 an Chondroitinsulfat (Glukosaminoglykan) auf der Zelloberfläche bindet und in den Viruseintritt involviert ist [18]. Ferner wurde in Virusbindungsassays nicht nur die VACV-Infektion bei der Adsorption an die Zelloberfläche durch lösliches D8 blockiert, sondern auch eine schlechtere Bindung von *D8L*-Mutanten an BSC40-Zellen gezeigt. Die Virusreplikation war im Vergleich zum Kontrollvirus um 10% gehemmt [18]. In dieser Arbeit wurde die Transkription von *D8L* effektiv durch die AB11-shRNA inhibiert und gleichzeitig der Virustiter im Vergleich zur Kontrolle um 60 bis 82% reduziert. *D8L* scheint daher bei der Virusvermehrung und Virusausbreitung von Zelle zu Zelle eine wesentliche Rolle zu spielen und könnte folglich ein potentiell Zielgen für eine OPV-Therapie sein.

Ein weiteres Membranprotein auf der Oberfläche von IMV-Partikeln wird durch das *A27L*-Gen kodiert. Dieses Protein bindet an Heparinsulfat (Glukosaminoglykan) auf der Zelloberfläche und ist in die Viruspenetration involviert [18,50]. Weiterhin ist A27 an der Entstehung von IEVs beteiligt, da es für den Mikrotubuli-abhängigen Transport der IMV-Partikel von den Virusfabriken zum Ort der IEV-Bildung unerlässlich ist [108]. A27 ist ein multifunktionelles Protein und repräsentiert deshalb ein geeignetes Target für eine RNAi-Strategie. In Vorversuchen wurde die Transkription von *A27L* am besten durch die AB08-shRNA inhibiert. Diese wies die größte antivirale Aktivität auf, wodurch die Virusreplikation von Calpoxvirus am stärksten inhibiert wurde. Die AB08-shRNA liegt in einem konservierten Bereich des *A27L*-Gens innerhalb des Genus der OPV, so dass die *A27L*-Expression verschiedener VACV-, CPXV-, CMLV- und MPXV-Stämme einschließlich des VARV effektiv inhibiert werden sollte. Nur das ECTV-MOS weist in diesem Sequenzbereich einen Nukleotidaustausch auf, der zu einer Reduktion der Inhibition führen kann [90,129]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Inhibition der *A27L*-Expression in Calpoxvirus- und VACV-LE-infizierten 293-Zellen auf RNA-Ebene mit der real-time PCR und im Western Blot auf Proteinebene nachgewiesen. Sowohl die Menge an intrazellulärer Virus-DNA als auch der infektiöse Virustiter waren bei beiden OPV-Spezies im Vergleich zu den Kontrollzellen erniedrigt. Es ist anzunehmen, dass die *A27L*-Expression bereits im ersten Replikationszyklus durch die AB08-shRNA inhibiert wurde und aufgrund der Unterrepräsentation von A27 weniger IEV-Partikel generiert wurden. Als Folge wurden weniger EEV-Partikel gebildet und die Bindung der Viruspartikel an die Zelloberfläche eingeschränkt. Im zweiten und dritten Replikationszyklus lag somit weniger Virus-DNA in der Zelle vor. Es war daher nicht überraschend, dass auch die Transkription anderer OPV-Gene wie z.B. von *D7R* im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert war. Infolge der reduzierten Genexpression wurden dann weniger Nachkommenviren produziert als in der Kontrolle. In weitergehenden Versuchen könnte mit Hilfe der Immunhistochemie z. B. im IFT gezeigt werden, dass die Infektion bei RNAi-behandelten Zellen im Wesentlichen auf die im ersten Replikationszyklus infizierten Zellen begrenzt bleibt und die Infektion nicht im gleichen Masse wie in den Kontrollzellen auf die Nachbarzellen übergreift.

In allen shRNA-Versuchen konnte die Virusreplikation nicht zu 100% inhibiert werden. Dies kann auf die durchschnittliche Transfektionseffizienz von ca. 50% zurückzuführen sein und weniger auf das Auftreten von Escape-Mutanten wie es für RNA-Viren beschrieben ist [147,148,149]. Es ist anzunehmen, dass die Selektion von Escape-Mutanten gegen shRNA

aufgrund der Stabilität des OPV-Genoms eine Vielzahl von Passagen erfordern würde [136]. In Versuchen in unserer Arbeitsgruppe, bei denen die Virusreplikation von OPV durch Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere (PMO) inhibiert wurde, wurden die OPV zehnmal unter Selektionsdruck passagiert und die PMO-Bindungsstelle sequenziert. Es wurden keine Nukleinsäureveränderungen im Hinblick auf das Ausgangsvirus nachgewiesen (Dr. A. Kurth und Dr. A. Nitsche, Robert Koch-Institut, Berlin, DE, unveröffentlichte Ergebnisse). Ferner wurde im Zusammenhang mit RNAi beschrieben, dass die Ausschüttung von Interferonen und inflammatorischen Cytokinen *in vitro* und *in vivo* durch zielfremde siRNAs induziert wird [150,151]. Die Induktion erfolgte in Abhängigkeit der siRNA-Sequenz und konnte teilweise auf den GU-Gehalt zurückgeführt werden. Weder das 5'-UGUGU-3'- noch das 5'-GUCCUCAA-3'-Motif ist Bestandteil des sense Stranges der in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Sequenzen, so dass die Reduktion in der Virusreplikation spezifisch auf die RNAi-Effekte zurückzuführen sein sollte.

Nach dem jetzigen Kenntnisstand, wurde in dieser Arbeit das erste Mal die Expression von Oberflächenproteinen durch shRNA inhibiert und dadurch die Virusvermehrung von OPV effektiv gehemmt. Berhanu *et al.* nutzte ebenso die in dieser Arbeit untersuchten OPV-Gene *A27L* und *D8L* und immunisierte BALB/c-Mäuse mit den rekombinant exprimierten VACV-Proteinen A27, D8 und B5. Die Mäuse waren vor einer letalen VACV-Infektion geschützt [152]. In weiteren Arbeiten konnte die OPV-Replikation durch die RNAi-vermittelte Inhibition von *E3L* und *D5R* gehemmt werden [136,153]. *E3L* kodiert für ein dsRNA-Bindeprotein und unterdrückt die zelluläre Interferonantwort. Die Ausschaltung dieses Proteins in infizierten Zellen ermöglicht folglich die Induktion einer Interferonantwort und somit die Unterdrückung der Virusreplikation durch Interferone. Das *D5R*-Gen kodiert für eine Nukleotidtriphosphatase und ist an der DNA-Replikation beteiligt. Valderrama führte mit Hilfe der RNAi-Technik die erste Funktionsstudie für das OPV-Gen *F11L* durch, in der die Interaktion mit RhoA und die Bedeutung für die Virusmorphogenese beschrieben wurde [154].

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der etablierten siRNA-Methode die Bedeutung von OPV-Genen für die Virusvermehrung untersucht werden kann. Dies ermöglicht die Identifikation von potentiellen Zielstrukturen für die Entwicklung von antiviralen Substanzen für die Behandlung einer OPV-Infektion. Da die Inhibition der OPV-Gene *K4L*, *D7R*, *D8L* und

A27L zu einer Reduktion der Virusvermehrung führte, stellen diese Gene mögliche Zielstrukturen für die Entwicklung antiviraler Substanzen dar.

4.4 RNAi als Therapieansatz gegen OPV-Infektionen

Seit der Entdeckung von RNAi in Mammalia-Zellen im Jahre 2001 [83] vergingen nur sechs Jahre von der hypothetischen Idee eines therapeutischen Einsatzes bis zur Phase II der klinischen Prüfung. Sehr früh wurde das antivirale Potential der RNAi erkannt und damit begonnen die Vermehrung verschiedener Viren in Mammalia-Zellen zu inhibieren [81,147,155]. Dazu gehörten auch Erreger von Atemwegserkrankungen wie das Influenzavirus [156], das Respiratorische Syncytialvirus (RSV) [93] oder das SARS-Coronavirus [157], deren Inhibition zunächst in Zellkultur und später *in vivo* gezeigt wurde. Die siRNA wurde jeweils intranasal injiziert und RNAi in den Lungen der infizierten Tiere induziert [158,159,160,161].

Der Hauptübertragungsweg für das VARV und andere OPV ist die respiratorische Route über die Schleimhaut des Nasopharyngealtraktes bis hin zu den regionalen Lymphknoten [3]. Da siRNAs bereits erfolgreich gegen Aerosol-übertragbare Viren eingesetzt wurde, könnte die Verabreichung von antiviralen Substanzen insbesondere der siRNA über die Atemwege, vor einer Infektion mit VARV schützen oder als Prophylaxe für OPV-Infektionen eingesetzt werden.

Der zellspezifische Einsatz von siRNA konnte *in vivo* durch die Verwendung von konjugierten, komplexierten und Polymer-basierten siRNAs gezeigt werden. Beispielsweise erreicht Cholesterol-konjugierte siRNA systemisch die Leberzellen in der Maus und LDL- bzw. HDL-konjugierte siRNAs werden nur zu Zellen mit LDL- oder SR-BI-Rezeptoren transportiert [162]. Komplexierte siRNAs können in der Zelle entweder ungerichtet zu einer Vielzahl von Zellen oder durch Kopplung an Rezeptorspezifische Peptide oder Antikörper gerichtet zu ihren Zielzellen transportiert werden [163,164]. Weitere Strategien sind der siRNA-gekoppelte Transport an RNA-Aptamere [165], die mit hoher Affinität und Spezifität an zelluläre Oberflächenrezeptoren binden sowie Polymer-basierte siRNAs, welche für den gerichteten Transport zielorientierte Liganden und Polyethylenglykolgruppen enthalten können [166]. OPV fusionieren mit auf der Zelloberfläche lokalisierten Glukosaminoglykanen [18,19,167]. Demnach könnten für die Behandlung einer OPV-Infektion konjugierte, komplexierte oder auch Polymer-basierte siRNAs verwendet werden,

die spezifisch an Glukosaminoglukane auf der Zelloberfläche binden. Inwieweit dies zu einer Hemmung der Virusausbreitung durch RNAi führt, muss untersucht werden.

Ungeachtet des schnellen Fortschritts und des therapeutischen Potentials zeigten sich in einem Mausmodell zur Therapie von Hepatitis B erstmals Nebenwirkungen, indem die verabreichte shRNA in Konkurrenz zum zelleigenen miRNA-System trat [168]. Seitdem wird vor allem versucht, chemisch synthetisierte siRNA in die Zellen zu transportieren. Ferner können siRNAs die Ausschüttung von Interferonen und inflammatorischen Cytokinen oder off-Target-Effekte hervorrufen [150,151,169]. Um diesen Nebeneffekte zu umgehen, könnte vor jeder therapeutischen siRNA-Anwendung eine Überprüfung des zellulären Expressionsprofils mit Hilfe der Microarray-Analyse erfolgen.

Vor allem für RNA-Viren ist das Auftreten von Escape-Mutanten unter Selektionsdruck beschrieben [147,148,149]. Eine begrenzte Anzahl von Mismatches kann die Wirkungsweise der siRNA negativ beeinflussen [129]. Aufgrund der Stabilität des VACV-Genoms würde die Selektion von Escape-Mutanten wahrscheinlich mehrere Passagen über einen längeren Zeitraum erfordern [136], so dass eine Reduktion in der Wirkungsweise der siRNA nicht zu erwarten wäre. Wenn eine Behandlung mit siRNA in Betracht gezogen würde, sollten siRNAs nur gegen konservierte Bereiche gerichtet sein. Vorstellbar wäre auch ein Gemisch von verschiedenen siRNAs gegen ein oder mehrere Zielgene, um das Risiko des Auftretens von Escape-Mutanten zu reduzieren. Dennoch könnte eine Therapie mit siRNA Vorteile bringen, da durch einfache Sequenzänderungen, die siRNA an jede neu auftretende Virus-Variante adaptiert werden kann. Dies erfordert weniger Zeit als die klassische Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe.

Bislang haben drei Firmen eine Therapie gegen Makula-Degeneration auf Basis der RNAi in der klinischen Erprobung (Phase I-III) [164]. Eine weitere therapeutische Anwendung ist gegen RSV gerichtet, das in der obersten Zellschicht des respiratorischen Epithels repliziert [170]. Im Tiermodell reduzierte die lokal applizierte ALN-RSV01-siRNA die RSV-Replikation im respiratorischen Trakt. In klinische Phase I Versuchen wurde die Sicherheit und die Verträglichkeit der siRNA an gesunden Probanden gezeigt, wobei ALN-RSV01 intranasal mittels eines Sprays appliziert wurde [171]. Da eine systemische OPV-Infektion in der Regel wie bei RSV im Respirationstrakt beginnt, wäre diese Verabreichung auch bei OPV-Infektionen vorstellbar.

In dieser Arbeit konnte die Inhibition von OPV-Genen durch RNAi und die damit verbundene Reduktion der Virusvermehrung *in vitro* gezeigt werden. Für eine *in vivo* siRNA-Therapie gegen OPV sollten zum Schutz vor Nukleasen chemisch modifizierte siRNAs [172,173,174] verwendet und deren Funktionalität *in vitro* sowie *in vivo* vor und nach der Infektion mit verschiedenen OPV überprüft werden. In Hinblick auf den Transport, die Verabreichung und Sicherheit kann sich an anderen Studien orientiert werden. Initiale *in vivo* Versuche könnten auf der Chorioallantoismembran im Hühnerei durchgeführt und anschließend auf ein etabliertes Tiermodell übertragen werden. Dazu könnte das nicht-humane Marmoset-Modell verwendet werden, in welchem das Calpoxvirus VARV-ähnliche Symptome hervorruft [8]. Unabhängig von den Überlegungen, siRNA als Ausgangssubstanz für die Entwicklung von neuen Therapeutika zu verwenden, eignet sich der Einsatz der RNAi bereits jetzt für die Identifizierung und Charakterisierung von OPV-Genen, wie dies in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte. Die RNAi stellt somit ein wertvolles Instrument dar, um zielgerichtet Auskunft über die Funktion von viralen Proteinen im Infektionszyklus zu erhalten. Die damit erhaltenen Erkenntnisse können dann z. B. auch für die Entwicklung von Therapeutika eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Fenner, F.; Henderson, D. A.; Arita, I.; Jezek, Z. und Ladnyi, I. D. (1988): Smallpox and its eradication, World Health Organization, Geneva
- [2] Moss, B. (2006): Poxviridae: The viruses and their replication, Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Roizman, B. und Straus, S. E., Fields Virology (Band 2), 5. Auflage, Seite 2905-45, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- [3] Damon, I. K. (2006): Poxviruses, Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Roizman, B. und Straus, S. E., Fields Virology (Band 2), 5. Auflage, Seite 2947-75, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- [4] Vorou, R. M.; Papavassiliou, V. G. und Pierrotsakos, I. N. (2008): Cowpox virus infection: an emerging health threat, Curr Opin Infect Dis (Band 21), Nr. 2, Seite 153-6
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (2003): Update: Multistate outbreak of monkeypox - Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003, MMWR Morb Mortal Wkly Rep (Band 52), Seite 642-6
- [6] McFadden, G. (2005): Poxvirus tropism, Nat Rev Microbiol (Band 3), Nr. 3, Seite 201-13
- [7] Mätz-Rensing, K.; Ellerbrok, H.; Ehlers, B.; Pauli, G.; Floto, A.; Alex, M.; Czerny, C. P. und Kaup, F. J. (2003): Fatal poxvirus outbreak in a colony of new world monkeys, Verh. ber. Erkr. Zootiere (Band 41), Seite 135-9
- [8] Kramski, M. (2008): Infections of common marmosets with calpoxvirus: A model for smallpox virus infections, Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin
- [9] Dubochet, J.; Adrian, M.; Richter, K.; Garces, J. und Wittek, R. (1994): Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy, J Virol (Band 68), Nr. 3, Seite 1935-41
- [10] Geshelin, P. und Berns, K. I. (1974): Characterization and localization of the naturally occurring cross-links in vaccinia virus DNA, J Mol Biol (Band 88), Nr. 4, Seite 785-96
- [11] Baroudy, B. M.; Venkatesan, S. und Moss, B. (1982): Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain, Cell (Band 28), Nr. 2, Seite 315-24
- [12] Moss, B. (2001): Poxviridae: The viruses and their replication, Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E.; Lamb, R. A.; Martin, M. A.; Roizman, B. und Straus, S. E., Fields Virology (Band 2), 4. Auflage, Seite 2849-83, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- [13] Goebel, S. J.; Johnson, G. P.; Perkus, M. E.; Davis, S. W.; Winslow, J. P. und Paoletti, E. (1990): The complete DNA sequence of vaccinia virus, Virology (Band 179), Nr. 1, Seite 247-66, 517-63
- [14] Condit, R. C.; Moussatche, N. und Traktman, P. (2006): In a nutshell: Structure and assembly of the vaccinia virion, Maramorosch, K. und Shatkin, A. J., Advances in Virus Research (Band 66) Seite 32-124, Academic Press Inc., U.S., San Diego
- [15] Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Rancaniello, V. R. und Skalka, A. M. (2003): Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis, and control, 2. Auflage, ASM Press, Washington
- [16] Vanderplasschen, A. und Smith, G. L. (1997): A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors, J Virol (Band 71), Nr. 5, Seite 4032-41
- [17] Vanderplasschen, A.; Hollinshead, M. und Smith, G. L. (1998): Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms, J Gen Virol (Band 79), Nr. 4, Seite 877-87
- [18] Hsiao, J. C.; Chung, C. S. und Chang, W. (1999): Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells, J Virol (Band 73), Seite 8750-61
- [19] Lin, C. L.; Chung, C. S.; Heine, H. G. und Chang, W. (2000): Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo, J Virol (Band 74), Nr. 7, Seite 3353-65
- [20] Locker, J. K.; Kuehn, A.; Schleich, S.; Rutter, G.; Hohenberg, H.; Wepf, R. und Griffiths, G. (2000): Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV, Mol Biol Cell (Band 11), Nr. 7, Seite 2497-511
- [21] McIntosh, A. A. und Smith, G. L. (1996): Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus, J Virol (Band 70), Nr. 1, Seite 272-81

-
- [22] Blackman, K. E. und Bubel, H. C. (1972): Origin of the vaccinia virus hemagglutinin, *J Virol* (Band 9), Nr. 2, Seite 290-6
- [23] Galmiche, M. C.; Goenaga, J.; Wittek, R. und Rindisbacher, L. (1999): Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens, *Virology* (Band 254), Nr. 1, Seite 71-80
- [24] Smith, G. L.; Murphy, B. J. und Law, M. (2003): Vaccinia virus motility, *Annu Rev Microbiol* (Band 57), Seite 323-42
- [25] Moss, B. (1996): *Poxviridae: The viruses and their replication*, 3. Auflage, Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Chanock, R. M.; Melnick, J. L.; Monath, T. P. und Roizman, B., Fundamental Virology, Lippincott-Raven, Philadelphia
- [26] Broyles, S. S. und Fesler, B. S. (1990): Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor, *J Virol* (Band 64), Nr. 4, Seite 1523-9
- [27] Gershon, P. D. und Moss, B. (1990): Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 11, Seite 4401-5
- [28] Li, J. und Broyles, S. S. (1993): Recruitment of vaccinia virus RNA polymerase to an early gene promoter by the viral early transcription factor, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 4, Seite 2773-80
- [29] Broyles, S. S. und Moss, B. (1988): DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor, *J Biol Chem* (Band 263), Nr. 22, Seite 10761-5
- [30] Oda, K. I. und Joklik, W. K. (1967): Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA, *J Mol Biol* (Band 27), Nr. 3, Seite 395-419
- [31] Baldick, C. J., Jr. und Moss, B. (1993): Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes, *J Virol* (Band 67), Nr. 6, Seite 3515-27
- [32] Keck, J. G.; Baldick, C. J., Jr. und Moss, B. (1990): Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: A naked template is required for transcription of three late trans-activator genes, *Cell* (Band 61), Nr. 5, Seite 801-9
- [33] Wright, C. F.; Keck, J. G.; Tsai, M. M. und Moss, B. (1991): A transcription factor for expression of vaccinia virus late genes is encoded by an intermediate gene, *J Virol* (Band 65), Nr. 7, Seite 3715-20
- [34] Keck, J. G.; Kovacs, G. R. und Moss, B. (1993): Overexpression, purification, and late transcription factor activity of the 17-kilodalton protein encoded by the vaccinia virus A1L gene, *J Virol* (Band 67), Nr. 10, Seite 5740-8
- [35] Hubbs, A. E. und Wright, C. F. (1996): The A2L intermediate gene product is required for in vitro transcription from a vaccinia virus late promoter, *J Virol* (Band 70), Nr. 1, Seite 327-31
- [36] Sebring, E. D. und Salzman, N. P. (1967): Metabolic properties of early and late vaccinia virus messenger ribonucleic acid, *J Virol* (Band 1), Nr. 3, Seite 550-8
- [37] Broyles, S. S. (2003): Vaccinia virus transcription, *J Gen Virol* (Band 84), Nr. 9, Seite 2293-303
- [38] Joklik, W. K. und Becker, Y. (1964): The replication and coating of vaccinia DNA, *J Mol Biol* (Band 10), Seite 452-74
- [39] Moss, B.; Winters, E. und Jones, E. V. (1983): Replication of vaccinia virus, Cozzarelli, N., *Mechanics of DNA replication and recombination* Seite 449-61, New York
- [40] Reddy, M. K. und Bauer, W. R. (1989): Activation of the vaccinia virus nicking-joining enzyme by trypsinization, *J Biol Chem* (Band 264), Nr. 1, Seite 443-9
- [41] Merchlinsky, M.; Garon, C. F. und Moss, B. (1988): Molecular cloning and sequence of the concatemer junction from vaccinia virus replicative DNA. Viral nuclease cleavage sites in cruciform structures, *J Mol Biol* (Band 199), Nr. 3, Seite 399-413
- [42] Lakritz, N.; Foglesong, P. D.; Reddy, M.; Baum, S.; Hurwitz, J. und Bauer, W. R. (1985): A vaccinia virus DNase preparation which cross-links superhelical DNA, *J Virol* (Band 53), Nr. 3, Seite 935-43
- [43] Hollinshead, M.; Vanderplasschen, A.; Smith, G. L. und Vaux, D. J. (1999): Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane, *J Virol* (Band 73), Seite 1503-17
- [44] Sodeik, B.; Griffiths, G.; Ericsson, M.; Moss, B. und Doms, R. W. (1994): Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65, *J Virol* (Band 68), Nr. 2, Seite 1103-14
- [45] Smith, G. L.; Vanderplasschen, A. und Law, M. (2002): The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus, *J Gen Virol* (Band 83), Nr. 12, Seite 2915-31

-
- [46] Rodriguez, D.; Rodriguez, J. R. und Esteban, M. (1993): The vaccinia virus 14-kilodalton fusion protein forms a stable complex with the processed protein encoded by the vaccinia virus A17L gene, *J Virol* (Band 67), Nr. 6, Seite 3435-40
- [47] Wallengren, K.; Risco, C.; Krijnse-Locker, J.; Esteban, M. und Rodriguez, D. (2001): The A17L gene product of vaccinia virus is exposed on the surface of IMV, *Virology* (Band 290), Nr. 1, Seite 143-52
- [48] Chung, C. S.; Hsiao, J. C.; Chang, Y. S. und Chang, W. (1998): A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate, *J Virol* (Band 72), Nr. 2, Seite 1577-85
- [49] Doms, R. W.; Blumenthal, R. und Moss, B. (1990): Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane, *J Virol* (Band 64), Nr. 10, Seite 4884-92
- [50] Rodriguez, J. F.; Paez, E. und Esteban, M. (1987): A 14,000-Mr envelope protein of vaccinia virus is involved in cell fusion and forms covalently linked trimers, *J Virol* (Band 61), Nr. 2, Seite 395-404
- [51] Hollinshead, M.; Rodger, G.; Van Eijl, H.; Law, M.; Hollinshead, R.; Vaux, D. J. und Smith, G. L. (2001): Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface, *J Cell Biol* (Band 154), Nr. 2, Seite 389-402
- [52] Blasco, R. und Moss, B. (1992): Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread, *J Virol* (Band 66), Nr. 7, Seite 4170-9
- [53] Payne, L. G. (1980): Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia, *J Gen Virol* (Band 50), Nr. 1, Seite 89-100
- [54] Alcamí, A. und Smith, G. L. (1992): A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: A novel mechanism of virus modulation of the host response to infection, *Cell* (Band 71), Nr. 1, Seite 153-67
- [55] Alcamí, A. und Smith, G. L. (1996): A mechanism for the inhibition of fever by a virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 20, Seite 11029-34
- [56] Reading, P. C. und Smith, G. L. (2003): A kinetic analysis of immune mediators in the lungs of mice infected with vaccinia virus and comparison with intradermal infection, *J Gen Virol* (Band 84), Nr. 8, Seite 1973-83
- [57] Jacobs, B. L. und Langland, J. O. (1996): When two strands are better than one: The mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA, *Virology* (Band 219), Nr. 2, Seite 339-49
- [58] Haller, O.; Kochs, G. und Weber, F. (2006): The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses, *Virology* (Band 344), Nr. 1, Seite 119-30
- [59] Shchelkunov, S. N.; Safronov, P. F.; Totmenin, A. V.; Petrov, N. A.; Ryazankina, O. I.; Gutorov, V. V. und Kotwal, G. J. (1998): The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins, *Virology* (Band 243), Nr. 2, Seite 432-60
- [60] Alcamí, A.; Khanna, A.; Paul, N. L. und Smith, G. L. (1999): Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors, *J Gen Virol* (Band 80), Nr. 4, Seite 949-59
- [61] Shchelkunov, S. N. (2003): Immunomodulatory proteins of orthopoxviruses, *Mol Biol (Mosk)* (Band 37), Nr. 1, Seite 41-53
- [62] Smith, G. L. und Vanderplasschen, A. (1998): Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion, *Adv Exp Med Biol* (Band 440), Seite 395-414
- [63] Rodriguez, J. R.; Risco, C.; Carrascosa, J. L.; Esteban, M. und Rodriguez, D. (1997): Characterization of early stages in vaccinia virus membrane biogenesis: Implications of the 21-kilodalton protein and a newly identified 15-kilodalton envelope protein, *J Virol* (Band 71), Nr. 3, Seite 1821-33
- [64] Smith, G. L. und McFadden, G. (2002): Smallpox: anything to declare?, *Nat Rev Immunol* (Band 2), Nr. 7, Seite 521-7
- [65] Bray, M. (2003): Pathogenesis and potential antiviral therapy of complications of smallpox vaccination, *Antiviral Res* (Band 58), Nr. 2, Seite 101-14
- [66] Fulginiti, V. A.; Papier, A.; Lane, J. M.; Neff, J. M. und Henderson, D. A. (2003): Smallpox vaccination: A review, part II. Adverse events, *Clin Infect Dis* (Band 37), Nr. 2, Seite 251-71
- [67] Mayr, A.; Stickl, H.; Muller, H. K.; Danner, K. und Singer, H. (1978): The smallpox vaccination strain MVA: Marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in

- organisms with a debilitated defence mechanism, Zentralbl Bakteriol [B] (Band 167), Nr. 5-6, Seite 375-90
- [68] Stickl, H.; Hochstein-Mintzel, V.; Mayr, A.; Huber, H. C.; Schafer, H. und Holzner, A. (1974): MVA vaccination against smallpox: Clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA), Dtsch Med Wochenschr (Band 99), Nr. 47, Seite 2386-92
- [69] Earl, P. L.; Americo, J. L.; Wyatt, L. S.; Eller, L. A.; Whitbeck, J. C.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Hartmann, C. J.; Jackson, D. L.; Kulesh, D. A.; Martinez, M. J.; Miller, D. M.; Mucker, E. M.; Shamblin, J. D.; Zwiers, S. H.; Huggins, J. W.; Jahrling, P. B. und Moss, B. (2004): Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox, Nature (Band 428), Nr. 6979, Seite 182-5
- [70] Quenelle, D. C.; Collins, D. J. und Kern, E. R. (2003): Efficacy of multiple- or single-dose cidofovir against vaccinia and cowpox virus infections in mice, Antimicrob Agents Chemother (Band 47), Nr. 10, Seite 3275-80
- [71] Baker, R. O.; Bray, M. und Huggins, J. W. (2003): Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections, Antiviral Res (Band 57), Nr. 1-2, Seite 13-23
- [72] Bailey, T. R.; Rippin, S. R.; Opsitnick, E.; Burns, C. J.; Pevear, D. C.; Collett, M. S.; Rhodes, G.; Tohan, S.; Huggins, J. W.; Baker, R. O.; Kern, E. R.; Keith, K. A.; Dai, D.; Yang, G.; Hraby, D. und Jordan, R. (2007): N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[f]isindol-2-(1H)-yl)carboxamides: Identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors, J Med Chem (Band 50), Nr. 7, Seite 1442-4
- [73] Yang, G.; Pevear, D. C.; Davies, M. H.; Collett, M. S.; Bailey, T.; Rippen, S.; Barone, L.; Burns, C.; Rhodes, G.; Tohan, S.; Huggins, J. W.; Baker, R. O.; Buller, R. L.; Touchette, E.; Waller, K.; Schriewer, J.; Neyts, J.; DeClercq, E.; Jones, K.; Hraby, D. und Jordan, R. (2005): An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge, J Virol (Band 79), Nr. 20, Seite 13139-49
- [74] Quenelle, D. C.; Buller, R. M.; Parker, S.; Keith, K. A.; Hraby, D. E.; Jordan, R. und Kern, E. R. (2007): Efficacy of delayed treatment with ST-246 given orally against systemic orthopoxvirus infections in mice, Antimicrob Agents Chemother (Band 51), Nr. 2, Seite 689-95
- [75] Sbrana, E.; Jordan, R.; Hraby, D. E.; Mateo, R. I.; Xiao, S. Y.; Siirin, M.; Newman, P. C.; Ap, D. A. Rosa und Tesh, R. B. (2007): Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe orthopoxvirus infection, Am J Trop Med Hyg (Band 76), Nr. 4, Seite 768-73
- [76] Marris, E. (2007): Dramatic rescue relieves rare case of smallpox infection, Nat Med (Band 13), Nr. 5, Seite 517
- [77] Nitsche, A.; Kurth, A.; Dunkhorst, A.; Panke, O.; Sielaff, H.; Junge, W.; Muth, D.; Scheller, F.; Stocklein, W.; Dahmen, C.; Pauli, G. und Kage, A. (2007): One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX, BMC Biotechnol (Band 7), Nr. 48, Seite 1-12
- [78] el-Awady, M. K.; el-Din, N. G.; el-Garf, W. T.; Youssef, S. S.; Omran, M. H.; el-Abd, J. und Goueli, S. A. (2006): Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus genotype 4 replication in HepG2 cells, Cancer Cell Int (Band 6), Nr. 18, Seite 1-9
- [79] Lisziewicz, J.; Sun, D.; Klotman, M.; Agrawal, S.; Zamecnik, P. und Gallo, R. (1992): Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligonucleotides: an in vitro model for treatment, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 89), Nr. 23, Seite 11209-13
- [80] Hamasaki, K.; Nakao, K.; Matsumoto, K.; Ichikawa, T.; Ishikawa, H. und Eguchi, K. (2003): Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication, FEBS Lett (Band 543), Nr. 1-3, Seite 51-4
- [81] Lee, N. S.; Dohjima, T.; Bauer, G.; Li, H.; Li, M. J.; Ehsani, A.; Salvaterra, P. und Rossi, J. (2002): Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells, Nat Biotechnol (Band 20), Nr. 5, Seite 500-5
- [82] Warfield, K. L.; Swenson, D. L.; Olinger, G. G.; Nichols, D. K.; Pratt, W. D.; Blouch, R.; Stein, D. A.; Aman, M. J.; Iversen, P. L. und Bavari, S. (2006): Gene-specific countermeasures against ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers, PLoS Pathog (Band 2), Nr. 1, Seite 5-13
- [83] Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K. und Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature (Band 411), Nr. 6836, Seite 494-8

-
- [84] Sontheimer, E. J. und Carthew, R. W. (2005): Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs, *Cell* (Band 122), Nr. 1, Seite 9-12
- [85] Hammond, S. M. (2005): Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway, *FEBS Lett* (Band 579), Nr. 26, Seite 5822-9
- [86] Hammond, S. M.; Bernstein, E.; Beach, D. und Hannon, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells, *Nature* (Band 404), Nr. 6775, Seite 293-6
- [87] Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G. und Tuschl, T. (2004): Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs, *Mol Cell* (Band 15), Nr. 2, Seite 185-97
- [88] Nykanen, A.; Haley, B. und Zamore, P. D. (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, *Cell* (Band 107), Nr. 3, Seite 309-21
- [89] Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Luhrmann, R. und Tuschl, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi, *Cell* (Band 110), Nr. 5, Seite 563-74
- [90] Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Weber, K. und Tuschl, T. (2002): Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs, *Methods* (Band 26), Nr. 2, Seite 199-213
- [91] Reuter, T.; Weissbrich, B.; Schneider-Schaulies, S. und Schneider-Schaulies, J. (2006): RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription, *J Virol* (Band 80), Nr. 12, Seite 5951-7
- [92] Yu, J. Y.; DeRuiter, S. L. und Turner, D. L. (2002): RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 99), Nr. 9, Seite 6047-52
- [93] Bitko, V. und Barik, S. (2001): Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses, *BMC Microbiol* (Band 1), Nr. 34, Seite 1-11
- [94] Song, E.; Lee, S. K.; Wang, J.; Ince, N.; Ouyang, N.; Min, J.; Chen, J.; Shankar, P. und Lieberman, J. (2003): RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis, *Nat Med* (Band 9), Nr. 3, Seite 347-51
- [95] McCaffrey, A. P.; Nakai, H.; Pandey, K.; Huang, Z.; Salazar, F. H.; Xu, H.; Wieland, S. F.; Marion, P. L. und Kay, M. A. (2003): Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference, *Nat Biotechnol* (Band 21), Nr. 6, Seite 639-44
- [96] Rutz, S. und Scheffold, A. (2004): Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems, *Arthritis Res Ther* (Band 6), Nr. 2, Seite 78-85
- [97] van Kuppeveld, F. J.; Melchers, W. J.; Willemse, H. F.; Kissing, J.; Galama, J. M. und van der Logt, J. T. (1993): Detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimentally infected laboratory rats by 16S rRNA amplification, *J Clin Microbiol* (Band 31), Nr. 3, Seite 524-7
- [98] Spearman, C. und Kärber, G. (1974): Biometrie, Cavalli-Sforza, L., *Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik*, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart
- [99] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7
- [100] Polson, A.; von Wechmar, M. B. und van Regenmortel, M. H. (1980): Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens, *Immunol Commun* (Band 9), Seite 475-93
- [101] Carroll, M. W. und Moss, B. (1997): Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line, *Virology* (Band 238), Nr. 2, Seite 198-211
- [102] Afonso, C. L.; Tulman, E. R.; Lu, Z.; Zsak, L.; Sandybaev, N. T.; Kerembekova, U. Z.; Zaitsev, V. L.; Kutish, G. F. und Rock, D. L. (2002): The genome of camelpox virus, *Virology* (Band 295), Nr. 1, Seite 1-9
- [103] Steger, B. (2005): Genexpressionsstudien immunmodulierender Gene der Orthopockenviren, Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin
- [104] Quick, S. D. und Broyles, S. S. (1990): Vaccinia virus gene D7R encodes a 20,000-dalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase, *Virology* (Band 178), Nr. 2, Seite 603-5

-
- [105] Weintraub, S. und Dales, S. (1974): Biogenesis of poxviruses: genetically controlled modifications of structural and functional components of the plasma membrane, *Virology* (Band 60), Nr. 1, Seite 96-127
- [106] Eckert, D.; Williams, O.; Meseda, C. A. und Merchlinsky, M. (2005): Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035), *J Virol* (Band 79), Nr. 24, Seite 15084-90
- [107] Sonntag, M. (2007): Herstellung, Expression und Nachweis der rekombinanten Callithrixpockenproteine 14K, HA, D8L und RPO18, Studienarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin
- [108] Sanderson, C. M.; Hollinshead, M. und Smith, G. L. (2000): The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles, *J Gen Virol* (Band 81), Nr. 1, Seite 47-58
- [109] Moss, B. (1990): Poxviridae and their replication (Band 2), 2nd. Auflage, Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Chanock, R.M.; Hirsch, M.S.; Melnick, J.; Monath, T. und Roizman, B., *Virology*, Raven, New York
- [110] Moss, B. (1990): Regulation of vaccinia virus transcription, *Annu Rev Biochem* (Band 59), Seite 661-88
- [111] Balassu, T. C. und Robinson, A. J. (1987): Orf virus replication in bovine testis cells: Kinetics of viral DNA, polypeptide, and infectious virus production and analysis of virion polypeptides, *Arch Virol* (Band 97), Nr. 3-4, Seite 267-81
- [112] Prideaux, C. T. und Boyle, D. B. (1987): Fowlpox virus polypeptides: Sequential appearance and virion associated polypeptides, *Arch Virol* (Band 96), Nr. 3-4, Seite 185-99
- [113] Salzman, N. P. (1960): The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus, *Virology* (Band 10), Seite 150-2
- [114] Chahroudi, A.; Garber, D. A.; Reeves, P.; Liu, L.; Kalman, D. und Feinberg, M. B. (2006): Differences and similarities in viral life cycle progression and host cell physiology after infection of human dendritic cells with modified vaccinia virus Ankara and vaccinia virus, *J Virol* (Band 80), Nr. 17, Seite 8469-81
- [115] Sancho, M. C.; Schleich, S.; Griffiths, G. und Krijnse-Locker, J. (2002): The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis, *J Virol* (Band 76), Nr. 16, Seite 8318-34
- [116] Gallego-Gomez, J. C.; Risco, C.; Rodriguez, D.; Cabezas, P.; Guerra, S.; Carrascosa, J. L. und Esteban, M. (2003): Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells, *J Virol* (Band 77), Nr. 19, Seite 10606-22
- [117] Mayr, A. und Malicki, K. (1966): Attenuation of virulent fowl pox virus in tissue culture and characteristics of the attenuated virus, *Zentralbl Veterinarmed B* (Band 13), Nr. 1, Seite 1-13
- [118] Antoine, G.; Scheiflinger, F.; Dorner, F. und Falkner, F. G. (1998): The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses, *Virol* (Band 244), Nr. 2, Seite 365-96
- [119] Ahn, B. Y.; Jones, E. V. und Moss, B. (1990): Identification of the vaccinia virus gene encoding an 18-kilodalton subunit of RNA polymerase and demonstration of a 5' poly(A) leader on its early transcript, *J Virol* (Band 64), Nr. 6, Seite 3019-24
- [120] Kovacs, G. R.; Rosales, R.; Keck, J. G. und Moss, B. (1994): Modification of the cascade model for regulation of vaccinia virus gene expression: Purification of a prereplicative, late-stage-specific transcription factor, *J Virol* (Band 68), Nr. 5, Seite 3443-7
- [121] Kovacs, G. R. und Moss, B. (1996): The vaccinia virus H5R gene encodes late gene transcription factor 4: Purification, cloning, and overexpression, *J Virol* (Band 70), Nr. 10, Seite 6796-802
- [122] Maa, J. S.; Rodriguez, J. F. und Esteban, M. (1990): Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of vaccinia virus, *J Biol Chem* (Band 265), Nr. 3, Seite 1569-77
- [123] Ichihashi, Y. (1977): Vaccinia-specific hemagglutinin, *Virology* (Band 76), Nr. 2, Seite 527-38
- [124] Brown, C. K.; Turner, P. C. und Moyer, R. W. (1991): Molecular characterization of the vaccinia virus hemagglutinin gene, *J Virol* (Band 65), Nr. 7, Seite 3598-606
- [125] Chang, H. W.; Watson, J. C. und Jacobs, B. L. (1992): The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 11, Seite 4825-9

-
- [126] Beattie, E.; Denzler, K. L.; Tartaglia, J.; Perkus, M. E.; Paoletti, E. und Jacobs, B. L. (1995): Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene, *J Virol* (Band 69), Nr. 1, Seite 499-505
- [127] Brandt, T. A. und Jacobs, B. L. (2001): Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model, *J Virol* (Band 75), Nr. 2, Seite 850-6
- [128] Caplen, N. J.; Parrish, S.; Imani, F.; Fire, A. und Morgan, R. A. (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 17, Seite 9742-7
- [129] Elbashir, S. M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2001): Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate, *Embo J* (Band 20), Nr. 23, Seite 6877-88
- [130] Blasco, R. und Moss, B. (1991): Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein, *J Virol* (Band 65), Nr. 11, Seite 5910-20
- [131] Cao, J. X.; Koop, B. F. und Upton, C. (1997): A human homolog of the vaccinia virus HindIII K4L gene is a member of the phospholipase D superfamily, *Virus Res* (Band 48), Nr. 1, Seite 11-8
- [132] Seto, J.; Celenza, L. M.; Condit, R. C. und Niles, E. G. (1987): Genetic map of the vaccinia virus HindIII D fragment, *Virology* (Band 160), Nr. 1, Seite 110-9
- [133] Ahn, B. Y. und Moss, B. (1992): RNA polymerase-associated transcription specificity factor encoded by vaccinia virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 8, Seite 3536-40
- [134] Ahn, B. Y.; Gershon, P. D. und Moss, B. (1994): RNA polymerase-associated protein Rap94 confers promoter specificity for initiating transcription of vaccinia virus early stage genes, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 10, Seite 7552-7
- [135] Deng, L. und Shuman, S. (1994): A role for the H4 subunit of vaccinia RNA polymerase in transcription initiation at a viral early promoter, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 19, Seite 14323-8
- [136] Vigne, S.; Germi, R.; Duraffour, S.; Larrat, S.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Garin, D. und Crance, J. M. (2008): Specific inhibition of orthopoxvirus replication by a small interfering RNA targeting the D5R gene, *Antivir Ther* (Band 13), Nr. 3, Seite 357-68
- [137] Ichihashi, Y. (1996): Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization, *Virology* (Band 217), Nr. 2, Seite 478-85
- [138] Vanderplasschen, A.; Hollinshead, M. und Smith, G. L. (1997): Antibodies against vaccinia virus do not neutralize extracellular enveloped virus but prevent virus release from infected cells and comet formation, *J Gen Virol* (Band 78 (Pt 8)), Seite 2041-8
- [139] Mettenleiter, T. C. (1991): Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (Band 14), Nr. 2, Seite 151-63
- [140] Ichihashi, Y. und Dales, S. (1971): Biogenesis of poxviruses: Interrelationship between hemagglutinin production and polykaryocytosis, *Virology* (Band 46), Nr. 3, Seite 533-43
- [141] Nam, S. H.; Kidokoro, M.; Shida, H. und Hatanaka, M. (1988): Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease, *J Virol* (Band 62), Nr. 10, Seite 3718-28
- [142] Shida, H.; Tochikura, T.; Sato, T.; Konno, T.; Hirayoshi, K.; Seki, M.; Ito, Y.; Hatanaka, M.; Hinuma, Y.; Sugimoto, M. und et al. (1987): Effect of the recombinant vaccinia viruses that express HTLV-I envelope gene on HTLV-I infection, *Embo J* (Band 6), Nr. 11, Seite 3379-84
- [143] Flexner, C.; Hugin, A. und Moss, B. (1987): Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression, *Nature* (Band 330), Nr. 6145, Seite 259-62
- [144] Holen, T.; Amarzguioui, M.; Wiiger, M. T.; Babaie, E. und Prydz, H. (2002): Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor, *Nucleic Acids Res* (Band 30), Nr. 8, Seite 1757-66
- [145] Niles, E. G. und Seto, J. (1988): Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein, *J Virol* (Band 62), Nr. 10, Seite 3772-8
- [146] Rodriguez, J. R.; Rodriguez, D. und Esteban, M. (1992): Insertional inactivation of the vaccinia virus 32-kilodalton gene is associated with attenuation in mice and reduction of viral gene expression in polarized epithelial cells, *J Virol* (Band 66), Nr. 1, Seite 183-9

-
- [147] Gitlin, L.; Karelsky, S. und Andino, R. (2002): Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells, *Nature* (Band 418), Nr. 6896, Seite 430-4
- [148] Das, A. T.; Brummelkamp, T. R.; Westerhout, E. M.; Vink, M.; Madiredjo, M.; Bernards, R. und Berkhout, B. (2004): Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition, *J Virol* (Band 78), Nr. 5, Seite 2601-5
- [149] Boden, D.; Pusch, O.; Lee, F.; Tucker, L. und Ramratnam, B. (2003): Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference, *J Virol* (Band 77), Nr. 21, Seite 11531-5
- [150] Judge, A. D.; Sood, V.; Shaw, J. R.; Fang, D.; McClintock, K. und MacLachlan, I. (2005): Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA, *Nat Biotechnol* (Band 23), Nr. 4, Seite 457-62
- [151] Hornung, V.; Guenther-Biller, M.; Bourquin, C.; Ablasser, A.; Schlee, M.; Uematsu, S.; Noronha, A.; Manoharan, M.; Akira, S.; de Fougerolles, A.; Endres, S. und Hartmann, G. (2005): Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7, *Nat Med* (Band 11), Nr. 3, Seite 263-70
- [152] Berhanu, A.; Wilson, R. L.; Kirkwood-Watts, D. L.; King, D. S.; Warren, T. K.; Lund, S. A.; Brown, L. L.; Krupkin, A. K.; Vandermay, E.; Weimers, W.; Honeychurch, K. M.; Grosenbach, D. W.; Jones, K. F. und Hruby, D. E. (2008): Vaccination of BALB/c mice with *Escherichia coli*-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge, *J Virol* (Band 82), Nr. 7, Seite 3517-29
- [153] Dave, R. S.; McGettigan, J. P.; Qureshi, T.; Schnell, M. J.; Nunnari, G. und Pomerantz, R. J. (2006): siRNA targeting vaccinia virus double-stranded RNA binding protein [E3L] exerts potent antiviral effects, *Virology* (Band 348), Nr. 2, Seite 489-97
- [154] Valderrama, F.; Cordeiro, J. V.; Schleich, S.; Frischknecht, F. und Way, M. (2006): Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling, *Science* (Band 311), Nr. 5759, Seite 377-81
- [155] Karlas, A.; Kurth, R. und Denner, J. (2004): Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation, *Virology* (Band 325), Nr. 1, Seite 18-23
- [156] Ge, Q.; McManus, M. T.; Nguyen, T.; Shen, C. H.; Sharp, P. A.; Eisen, H. N. und Chen, J. (2003): RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 5, Seite 2718-23
- [157] Zheng, B. J.; Guan, Y.; Tang, Q.; Du, C.; Xie, F. Y.; He, M. L.; Chan, K. W.; Wong, K. L.; Lader, E.; Woodle, M. C.; Lu, P. Y.; Li, B. und Zhong, N. (2004): Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus, *Antivir Ther* (Band 9), Nr. 3, Seite 365-74
- [158] Li, B. J.; Tang, Q.; Cheng, D.; Qin, C.; Xie, F. Y.; Wei, Q.; Xu, J.; Liu, Y.; Zheng, B. J.; Woodle, M. C.; Zhong, N. und Lu, P. Y. (2005): Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque, *Nat Med* (Band 11), Nr. 9, Seite 944-51
- [159] Tompkins, S. M.; Lo, C. Y.; Tumpey, T. M. und Epstein, S. L. (2004): Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 23, Seite 8682-6
- [160] Bitko, V.; Musiyenko, A.; Shulyayeva, O. und Barik, S. (2005): Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA, *Nat Med* (Band 11), Nr. 1, Seite 50-5
- [161] Zhang, W.; Yang, H.; Kong, X.; Mohapatra, S.; San Juan-Vergara, H.; Hellermann, G.; Behera, S.; Singam, R.; Lockey, R. F. und Mohapatra, S. S. (2005): Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene, *Nat Med* (Band 11), Nr. 1, Seite 56-62
- [162] Wolfrum, C.; Shi, S.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Wang, G.; Pandey, R. K.; Rajeev, K. G.; Nakayama, T.; Charrise, K.; Ndungo, E. M.; Zimmermann, T.; Kotliansky, V.; Manoharan, M. und Stoffel, M. (2007): Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs, *Nat Biotechnol* (Band 25), Nr. 10, Seite 1149-57
- [163] Song, E.; Zhu, P.; Lee, S. K.; Chowdhury, D.; Kussman, S.; Dykxhoorn, D. M.; Feng, Y.; Palliser, D.; Weiner, D. B.; Shankar, P.; Marasco, W. A. und Lieberman, J. (2005): Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, *Nat Biotechnol* (Band 23), Nr. 6, Seite 709-17

-
- [164] Novobrantseva, T. I.; Akinc, A.; Borodovsky, A. und de Fougerolles, A. (2008): Delivering silence: Advancements in developing siRNA therapeutics, *Curr Opin Drug Discov Devel* (Band 11), Nr. 2, Seite 217-24
- [165] McNamara, J. O., 2nd; Andrechek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A. und Giangrande, P. H. (2006): Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras, *Nat Biotechnol* (Band 24), Nr. 8, Seite 1005-15
- [166] Hu-Lieskovan, S.; Heidel, J. D.; Bartlett, D. W.; Davis, M. E. und Triche, T. J. (2005): Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma, *Cancer Res* (Band 65), Nr. 19, Seite 8984-92
- [167] Hsiao, J. C.; Chung, C. S. und Chang, W. (1998): Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain, *J Virol* (Band 72), Nr. 10, Seite 8374-9
- [168] Grimm, D.; Streetz, K. L.; Jopling, C. L.; Storm, T. A.; Pandey, K.; Davis, C. R.; Marion, P.; Salazar, F. und Kay, M. A. (2006): Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways, *Nature* (Band 441), Nr. 7092, Seite 537-41
- [169] Jackson, A. L.; Bartz, S. R.; Schelter, J.; Kobayashi, S. V.; Burchard, J.; Mao, M.; Li, B.; Cavet, G. und Linsley, P. S. (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi, *Nat Biotechnol* (Band 21), Nr. 6, Seite 635-7
- [170] Zhang, L.; Peeples, M. E.; Boucher, R. C.; Collins, P. L. und Pickles, R. J. (2002): Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology, *J Virol* (Band 76), Nr. 11, Seite 5654-66
- [171] Devincenzo, J.; Cehelsky, J. E.; Alvarez, R.; Elbashir, S.; Harborth, J.; Toudjarska, I.; Nechev, L.; Murugaiah, V.; Vliet, A. V.; Vaishnav, A. K. und Meyers, R. (2008): Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV), *Antiviral Res* (Band 77), Nr. 3, Seite 225-31
- [172] Santel, A.; Aleku, M.; Keil, O.; Endruschat, J.; Esche, V.; Fisch, G.; Dames, S.; Löffler, K.; Fechtner, M.; Arnold, W.; Giese, K.; Klippel, A. und Kaufmann, J. (2006): A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium, *Gene Ther* (Band 13), Nr. 16, Seite 1222-34
- [173] Santel, A.; Aleku, M.; Keil, O.; Endruschat, J.; Esche, V.; Durieux, B.; Löffler, K.; Fechtner, M.; Rohl, T.; Fisch, G.; Dames, S.; Arnold, W.; Giese, K.; Klippel, A. und Kaufmann, J. (2006): RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy, *Gene Ther* (Band 13), Nr. 18, Seite 1360-70
- [174] Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Rohl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliensky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M. und Vornlocher, H. P. (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs, *Nature* (Band 432), Nr. 7014, Seite 173-8

Autorenerklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden. Die Dissertation oder Teile davon wurden noch nicht als Prüfungsarbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin oder an einer anderen Einrichtung für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Begutachtung eingereicht.

Berlin, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen Bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Heinz Ellerbrok danke ich für die finanzielle Einwerbung und Betreuung des Projektes sowie für die gewährten Freiräume. Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Georg Pauli** für seine Diskussionsbereitschaft und das kritische Lesen dieser Arbeit. **Prof. Dr. Detlev H. Krüger** danke ich für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin.

Ich möchte mich bei **Dr. Sandra Eßbauer** (Ludwig-Maximilians-Universität, München) für die Bereitstellung des CMLV-Isolates sowie bei **Prof. Dr. Dr. Claus-Peter Czerny** (Georg-August-Universität, Göttingen) für den monoklonalen Maus-anti-A27-Antikörper bedanken. Herrn **Prof. Dr. Rüdiger Schade** (Charité, Berlin) danke ich für die Immunisierung von Huhn 35 sowie für die Aufreinigung der IgY-Antikörper. Mein Dank geht ferner an **Marcel Müller**, der mir Rosetta ans Herz gelegt hat und mit Tipps zum Western Blot zur Verfügung stand.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe **ZBS1**, aber auch bei **P11** sowie **ZV3.4** für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken. **Dr. Andreas Nitsche** danke ich für die Hilfe beim PCR-Design, die fachlichen Diskussionen und Anregungen. Besonders bedanken möchte ich mich bei **Jung-Wong Sim-Brandenburg**, die mich mit der Virusanzucht und weiteren Zellkulturtechniken vertraut gemacht hat. Bei **Julia Tesch** und **Ute Kramer** bedanke ich mich für die Durchführung der automatischen Sequenzierungen. Weiterhin danke ich **Maren Helwig** für die Auskünfte zur rekombinanten Proteinexpression und **Marco Kaiser** für seine Hilfe bei der Aufreinigung der rekombinanten Proteine.

Bei **Marit Kramski**, **Sonja Linke**, **Maren Helwig** und **Hanno von Spreckelsen** möchte ich mich für die schöne Zeit im Labor als auch für die fachlichen Diskussionen bedanken.

Meinen Eltern **Angela** und **Achim Hergesell** danke ich ganz herzlich für ihre stete Unterstützung und ihr Vertrauen auf allen meinen Wegen.

Meinem Mann **Marco Reiche** danke ich vor allem für sein Verständnis während der zahlreichen Entbehrungen sowie für seine Unterstützung.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird in meiner Arbeit aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.

Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Hergesell J., Schweiger B.; Rhinoviruserkrankungen.; Handbuch der Infektionskrankheiten; 26. Ergänzungslieferung; Juni 2008; VIII-6.38; Buchkapitel

Reiche J., Schweiger B.; Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus Group A Isolated over Nine Consecutive Seasons in Germany; J Clin Microbiol. 2009 Jun; 47 (6): 1800-10. Epub 2009 Apr 22

Reiche J., Pauli G., Ellerbrok H.; Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation; submitted

Witkowski P.T., Vogt A., Niedrig D., **Reiche J.**, Bourquain D.R., Nitsche A.; RNAi reveals: Expression of anti-apoptotic Proteins is not required for Orthopoxvirus Replication *in vitro*; submitted

Reiche J., Ellerbrok H.; Specific inhibition of orthopoxvirus replication by short hairpin siRNAs targeting the *D7R*, *K4L*, *D8L* and *A27L* genes.; Manuskript in Vorbereitung

Poster

Reiche J., Schweiger B.; Identification of a new RSV group B genotypes and high variability of group B viruses in Germany.; 19th Annual Meeting of the Society for Virology, 18.-21. März 2009 in Leipzig

Wadl M., **Reiche J.**, Schweiger B., Köpke K., Do small children with influenza-like-illness really have influenza?; European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology, 19.-21. November 2008 in Berlin

Hergesell J., Schweiger B., Circulation of different RSV A genotypes in Germany. ; Third European Congress of Virology, 1.-5. September 2007 in Nürnberg

Hergesell J., Ellerbrok H.; Inhibition of orthopoxvirus replication by RNA interference.; Third European Congress of Virology, 1.-5. September 2007 in Nürnberg

Hergesell J., Ellerbrok H., Inhibition of orthopoxvirus replication by RNA interference.; 16th Annual Meeting of the Society for Virology, 15.-18. März 2006 in München

Fleischhacker M., Radonic A., **Hergesell J.**, Weickmann S., Schmidt B.; Welche Referenzgene eignen sich am besten für Expressionsuntersuchungen von Lungentumoren mittels real-time PCR?; 14. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie, 2.- 4. Juni 2005 in Berlin

Hergesell J., Mahiny A., Ellerbrok H.; Quantification of different HERV-K transcripts in UV irradiated cells by real-time PCR.; 13th Annual Meeting of the Society for Virology, 26.-29. März 2003 in Berlin

Vorträge

Hergesell J., Pauli G., Ellerbrok H.; Untersuchungen zur Expression und Inhibition von Orthopockenvirus-Genen.; Institutsseminar, Robert Koch-Institut, 2008

Hergesell J., Pauli G., Ellerbrok H.; Expressionsanalyse von Orthopockenvirus-Genen.; Virologisches Seminar, Robert Koch-Institut, 2006

Hergesell J., Kramski M.; Sequenzierung.; 90 Minuten im Rahmen einer Vorlesungsreihe des Studienganges Medizinische Biotechnologie, Robert Koch-Institut, WS 2004/05 und WS 2006/07